

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

Факультет 2 медичний

УДК: 616.24 – 007.272 – 036.1 - 092

Вайло Валерія Вікторівна

Група 2мл

Морфологічні особливості компонентів сполучної тканини легень при експериментальному алергічному запаленні

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА

зі спеціальності

224 «Технології медичної діагностики та лікування»

Галузь знань 22 «Лабораторна діагностика»

Освітня програма «Лабораторна діагностика»

Науковий керівник:

доцент кафедри гістології,

цитології та ембріології,

кандидат медичних наук

Попко Світлана Сергіївна

Запоріжжя 2023 р.

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

Факультет 2 медичний

Кафедра гістології, цитології та ембріології

Галузь знань 22 «Охорона здоров'я»

Спеціальність 224 «Технології медичної діагностики та лікування»

Освітня програма «Лабораторна діагностика»

Освітня програма вищої освіти України Другий магістерський рівень

Кваліфікація освіти, що присвоюється Магістр

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА

на тему

Морфологічні особливості компонентів сполучної тканини легень при експериментальному алергічному запаленні

Студент Вайло Валерія Вікторівна Група 2 мл

КЕРІВНИК РОБОТИ Доц. кафедри гістології, цитології та ембріології,
кандидат медичних наук

Попко Світлана Сергіївна _____

(підпис)

РЕЦЕНЗЕНТ завідувач кафедри медичної біології, паразитології та генетики,
доцент, доктор біологічних наук

Приходько Олександр Борисович _____

(підпис)

Робота розглянута на засіданні кафедри (протокол від «15» грудня 2022 р.
№ 5) і допущена до захисту.

В. О. ЗАВІДУВАЧА КАФЕДРИ доцент, кандидат біологічних наук,
Потоцька Олена Іванівна _____

(підпис)

Запоріжжя 2023 р.

РЕФЕРАТ

Магістерська робота: 57с., 12 рис., 1 табл., 45 джерел.

Актуальність. Бронхіальна астма (БА) займає чільне місце у структурі бронхолегеневої захворюваності у дітей та дорослих. Тяжкі, неконтрольовані, терапевтично резистентні форми бронхіальної астми є значущою медико-соціальною проблемою, нерідко асоційовані з високим ризиком смерті, частими життєзагрозливими загостреннями, високою інвалідизацією, різким зниженням якості життя пацієнтів.

Поліморфізм важкої астми та контроль за її перебігом багато в чому залежить від структурних порушень стінки бронхів і судин, що входять до її складу [1, 2]. Дебютом морфологічних змін дихальних шляхів при тяжкій неконтрольованій БА виступає сполучнотканинна гіперплазія, яка, будучи одним з компонентів ремоделювання бронхів, посилює дихальну недостатність, гіпоксемію та гіпоксію тканин [2, 3].

Незважаючи на досягнення у вивченні структурної дезорганізації бронхіальної стінки, морфологічна основа регуляторних розладів, що реалізуються у бронхіальному дереві у пацієнтів з астмою, залишається маловивченою.

Мета дослідження: встановити морфологічні особливості компонентів сполучної тканини легень морських свинок при експериментальному алергічному запаленні.

Задачі дослідження:

1. Дослідити динаміку змін мастоцитів слизових оболонок, навколосудинних мастоцитів та кровоносних капілярів у легнях морських свинок за умов сенсibiliзації овальбуміном.

2. З'ясувати гістохімічні особливості розподілу PAS-позитивного матеріалу в стінці дихальних шляхів і в респіраторному відділі легень морських свинок при розвитку місцевої запальної реакції після сенсibiliзації овальбуміном.

3. Визначити морфологічні особливості гістогенного диферону клітин сполучної тканини в легенях морських свинок за умов сенсibilізації овальбуміном.

Об'єкт дослідження: морфогенез легень морської свинки в нормі та за умов сенсibilізації овальбуміном.

Предмет дослідження: структура сполучної тканини легень морської свинки в нормі та за умов сенсibilізації овальбуміном.

Методи дослідження: експериментальний, морфометричний, гістохімічний, електронномікроскопічний, статистичний.

Елементи наукової новизни. Поглиблені уявлення про зміни кількості ефекторних клітин у різні періоди розвитку запалення. Доповнені знання про ультраструктурні особливості та доведено зв'язок між співвідношенням клітин і прогресуванням структурних порушень в легенях. Продемонстровано динамічні зміни сполучнотканинних компонентів в хронобіологічному аспекті.

Практичне значення роботи. Результати детального вивчення гістоструктури клітинного компоненту та позаклітинного матриксу сполучної тканини легень, отримані за допомогою сучасних методів дослідження, можуть внести ясність в проблему патоморфозу дихальних шляхів при алергічних захворюваннях та знайдуть практичне використання в роботі морфологів, імунологів, пульмонологів.

Перелік ключових слів: СПОЛУЧНА ТКАНИНА, ПОЗАКЛІТИННА РЕЧОВИНА, МАСТОЦИТИ, ФІБРОБЛАСТИ, ОВАЛЬБУМІН, АЛЕРГІЧНЕ ЗАПАЛЕННЯ, МОРСЬКА СВИНКА

Перелік умовних скорочень, символів, скорочень і термінів

IgE – імуноглобуліни класу E

IL – Інтерлейкіни – цитокіни, що відповідають за міжклітинні взаємодії між лейкоцитами

Th2 – Т-хелпери 2-го типу

БА – бронхіальна астма

НДІ – науково-дослідний інститут

ГАГ – глікозаміноглікани

МПВ – мікропіноцитозні везикули

ОВА – овальбумін

ЗМІСТ

Вступ	7
Розділ 1 Огляд літератури	9
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження	25
Розділ 3 Морфологічні зміни компонентів сполучної тканини легень морських свинок в динаміці алергічного запалення	28
3.1 Мастоцити слизових оболонок, навколосудинні мастоцити та кровеносні капіляри в легенях морських свинок за умов сенсibilізації овальбуміном	28
3.2 Гістохімічні особливості розподілу PAS-позитивного матеріалу в стінці дихальних шляхів і в респіраторному відділі легень	34
3.3 Морфологічні особливості гістогенного диферону клітин сполучної тканини в легенях морських свинок за умов сенсibilізації овальбуміном	38
Розділ 4 Аналіз та узагальнення отриманих результатів	45
Висновки	52
Список використаних джерел	53

ВСТУП

Після створення моделі на тваринах експериментального алергічного запалення дихальних шляхів вченими в основному досліджувалась реакція клітинної та гуморальної ланок набутого специфічного імунітета [4, 5]. Разом з тим відомо, що розвиток алергічного запалення дихальних шляхів є перш за все результатом відповіді системи локального вродженого імунітета на дію алергена [6, 7, 8]. Питання про реакцію компонентів вродженого імунітету, який забезпечують компоненти сполучної тканини дихальних шляхів в алергічному запаленні у хронобіологічному аспекті в експерименті залишається відкритим. Враховуючи вище наведене, встановлення сучасних наукових даних щодо морфологічних змін компонентів сполучної тканини при алергічному запальному процесі в легенях в хронобіологічному аспекті є актуальною проблемою медицини.

Мета дослідження – встановити морфологічні особливості компонентів сполучної тканини легень морських свинок при експериментальному алергічному запаленні.

Досягнення поставленої мети здійснювали шляхом вирішення наступних завдань:

1. Дослідити динаміку змін мастоцитів слизових оболонок, навколосудинних мастоцитів та кровоносних капілярів у легенях морських свинок за умов сенсibilізації овальбуміном.

2. З'ясувати гістохімічні особливості розподілу PAS-позитивного матеріалу в стінці дихальних шляхів і в респіраторному відділі легень морських свинок при розвитку місцевої запальної реакції після сенсibilізації овальбуміном.

3. Визначити морфологічні особливості гістогенного диферону клітин сполучної тканини в легенях морських свинок за умов сенсibilізації овальбуміном.

Об'єкт дослідження – морфогенез легень морської свинки в нормі та за умов сенсibilізації овальбуміном.

Предмет дослідження – структура сполучної тканини легень морської свинки в нормі та за умов сенсibilізації овальбуміном.

Методи дослідження – експериментальний, морфометричний, гістохімічний, електронномікроскопічний, статистичний:

- експериментальним методом змодельоване овалбумін-індуковане алергічне запалення в легенях морської свинки;
- морфометричним та мікроскопічним методами проведена оцінка динаміки клітинного складу фібробластичного диферону, мастоцитів;
- гістохімічними методами досліджені мастоцити, характер слизу келихоподібних клітин, розподіл в ньому та в позаклітинному матриксі сполучної тканини легень глікопротеїнів та глікозаміногліканів (PAS-реакція, альціановий синій);
- електронномікроскопічним методом вивчені ультрамікроскопічні зміни в мастоцитах, кровоносних капілярах;
- метод варіаційної статистики.

Таким чином, в цю проблему можуть внести ясність результати детального вивчення гістоструктури клітинного компоненту та позаклітинного матриксу сполучної тканини легень, отримані за допомогою сучасних методів дослідження.

Дані, що отримані щодо закономірностей морфогенезу мастоцитів, фібробластів, фіброцитів, гістохімічних змін позаклітинного матриксу сполучної тканини легень при дії факторів алергенного характеру, відтворених в експерименті, знайдуть практичне використання в роботі морфологів, імунологів, пульмонологів.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Останнім часом спостерігається стрімке зростання захворюваності на алергічні хвороби. За даними ВООЗ сьогодні від цих захворювань страждають від 20 до 40% людей. Це означає, що приблизно кожний 3-й мешканець планети Земля – алергік, незалежно від віку та національності. У нашій країні, відповідно до офіційної статистики, алергічними захворюваннями страждають до 15% населення.

Алергічна реакція, що лежить в основі алергічного захворювання, є результатом неадекватної імунної відповіді на повторне потрапляння в організм алергену, яка провокує ушкодження власних тканин, порушення функції органів, окремих систем чи організму загалом [2]. Проте навіть у разі розвитку пошкодження алергійні реакції також розглядають як захисні, що сприяють локалізації алергену, який потрапив до організму, і його наступному видаленню з організму [9].

Алергічні захворювання за своєю природою складні і багатofакторні [10]. Сприяє розвитку алергії стан схильності організму до алергічних реакцій – атопія – генетично детерміноване порушення функції імунної системи за анафілактичним IgE-залежним типом, яке характеризується активацією системи Т-хелперів 2-го типу (Th2), що призводить до гіперпродукції IgE у відповідь на низькі дози алергенів [2, 6]. Розвиток атопічного захворювання залежить від взаємодії між генетичними факторами і дією алергенів навколишнього середовища (харчові і аероалергени), неспецифічними ад'ювантними факторами (куріння, забруднення повітря і інфекції). На сучасному етапі поширеність алергічної патології є не тільки медичною, а й соціальною проблемою, зумовленою втратою працездатності, інвалідністю і смертністю [10].

Ураження органів дихальної системи є частим явищем в умовах сьогодення. Функціональні особливості будови легень, посилений транспорт крові та газів – визначають високий ступінь інтенсивності пошкодження органу при дії різних екзо- і ендогенних факторів. Найбільш розповсюдженим механізмом потрапляння

агентів різного походження є інгаляційний, що характеризується гострим ураженням легень внаслідок впливу газів, летючих органічних сполук, тощо [11].

І, вочевидь, одним з найбільш поширених алергічних захворювань є бронхіальна астма – складне хронічне запальне захворювання дихальних шляхів, яке виникають внаслідок підвищеної чутливості повітропровідних шляхів до різних подразників зовнішнього середовища [12, 13]. У світі астмою хворіють 100 млн людей. Залежно від регіону, в Європі і США хворіють від 5 до 15% населення. За даними НДІ фтизіатрії і пульмонології, в Україні хворіє 2,5 млн людей. Збільшення частоти захворюваності зумовлене зростанням числа хворих на хронічні захворювання легень, забрудненням довкілля, широким використанням антибіотиків тощо [14].

Цей клінічний синдром характеризується нападopodobним перебігом, рецидивуючим характером епізодів обструкції повітряного потоку різної тривалості та інтенсивності [13, 15]. Під час нападів бронхіальної астми розвивається недостатність дихання, для якої характерним є утруднення видиху (експіраторна задишка) [16].

БА є одними із найчастіших причин розвитку бронхообструктивного синдрому, для неї характерна зворотна бронхообструкція, гіперреактивність бронхів, підвищена чутливість до різних подразнювальних факторів із формуванням бронхоспазму з дифузним порушенням прохідності бронхів, набряку стінки бронхів, обтурацією слизом з утворенням слизових пробок і поступовимиструктурними змінами та перебудовою стінок бронхів – ремоделінгом – внаслідок алергічного запалення [2, 16, 17].

Основними чинниками, що зумовлюють розвиток астми, є генетична схильність до гіперчутливості I типу (атопія), гостре і хронічне запалення дихальних шляхів, а також гіперреактивність бронхів до різних подразників. Астму можна класифікувати як атопічну (у разі сенсibiliзації алергеном) або неатопічну. При обох формах напади бронхоспазму можуть спричинити різноманітні агенти, такі як збудники респіраторних інфекцій (особливо вірусних), забруднювачі

повітря (наприклад, дим, випаровування), холодне повітря, стрес та фізичне навантаження [16, 18].

Атопічна бронхіальна астма – це найпоширеніша форма астми і класичний приклад реакції гіперчутливості I типу, опосередкованої IgE [18]. Реакції I типу ще називають анафілактичними, або гіперчутливістю негайного типу (immediate hypersensitivity). Їхня суть полягає в тому, що реакція “антиген-антитіло” відбувається на поверхні тканинних базофілів, причому антитіла (IgE) фіксовані до мембрани цих клітин, а антиген перебуває у вільному стані [19].

Атопічна бронхіальна астма розпочинається в дитячому віці. Існує спадкова схильність до захворювання. Її також провокують побутові алергени: домашній пил, пилок рослин, лусочки шкіри тварин і продукти харчування [13]. Сенсibiliзація до алергенів тваринного білка в ранньому віці є предиктором подальшого розвитку бронхіальної астми [10, 20].

Хворі з неатопічною формою астми не мають ознак сенсibiliзації алергеном; вірусні інфекції органів дихання і забруднювачі повітря - це типові провокувальні чинники. Але кінцеві гуморальні й клітинні медіатори обструкції дихальних шляхів (наприклад, еозинофіли) є типовими для атопічної і неатопічної форм астми, тому їх лікують однаково [18].

Класична атопічна форма зумовлена поступовою надмірною активацією Th2 під впливом алергену, що презентують макрофаги. Цитокіни, продуковані Th2, відповідають за більшість ознак атопічної астми, IL-4 та IL-13 стимулюють трансформацію В-лімфоцитів у плазматичні клітини та підвищений синтез IgE, IL-5 активує еозинофіли із збільшенням кількості на їх поверхні молекул адгезії, сприяючи насамперед збільшенню їх кількості в сполучній тканині легень, а IL-13 також стимулює продукування слизу [18, 21]. Збільшується кількість тучних клітин і базофілів, посилюється експресія на їх поверхні рецепторів до Fc-фрагмента IgE; IgE вкривають мастоцити (тканинні базофіли) в підслизовому прошарку, в разі дії алергену ці клітини (а згодом – і еозинофіли, нейтрофіли, тромбоцити) вивільняють уміст гранул – цитокіни та велику кількість біологічно активних речовин: гістамін, серотонін, гепарин, калікреїн, триптази, хілази, лейкотрієни,

тромбоцитаактивуючий фактор, хемотаксичні фактори, арилсульфатази, гістамінази, катіонні білки, протеази, простагландини тощо [2, 18]. Медіатори, вивільнені із клітин, зумовлюють дві фази реакції:

- в ранню патофізіологічну фазу самостійно або через нервову систему спричиняють бронхоспазм, підвищують проникність стінок судин мікроциркуляторного русла, стимулюють продукування слизу, а також зумовлюють міграцію лейкоцитів;

- реакція пізньої фази є запальною за походженням. Запальні медіатори стимулюють виділення хемокінів (у тому числі еотаксину – потужного хемоатрактанта й активатора еозинофілів) запальними клітинами, які зумовлюють залучення у процес Th2, еозинофілів та інших лейкоцитів, тим самим посилюючи запальну реакцію, ініційовану резидентними імунними клітинами [7, 13, 18]. Існують також різні варіанти запалення: еозинофільне (найпоширеніше враховуючи велику кількість еозинофілів у дихальних шляхах хворих), нейтрофільне, змішане та оліго-гранулоцитарне, яким властиві різні етіологія, імунопатологія та відповідь на лікування [18, 22].

У гострому періоді у стінках бронхів спостерігається повнокрів'я судин, набряк слизового та підслизового шарів, інфільтрація їх нейтрофілами, лімфоплазмоцитарними елементами з домішками еозинофілів, мастоцитів. У просвітах бронхів є слиз та злущений епітелій. У легеневій паренхімі – картина гострої обструктивної емфіземи, фокуси ателектазів [23].

У результаті частого повторення нападів у стінках бронхів розвивається хронічне запалення, атрофічні та склеротичні процеси. У легеневій паренхімі картина хронічної обструктивної емфіземи, склероз міжальвеолярних перегородок. У результаті розвивається альвеолярно-капілярний блок, гіпертензія легень та формується «легеневе» серце [18, 23]. У разі смерті в стані астматичного статусу спостерігають гостру емфізему легенів, яка поєднується з ділянками ателектазів. Отвори бронхів і бронхіол закупорюються густим в'язким слизом (слизовими пробками) [13]. Гістологічно в слизових пробках виявляють завитки пластів клітин зморщеного бронхового епітелію (спіралі Курціманна), численні еозинофіли та

кристалоподібні утворення з еозинофільного білка галектину-10 (кристали Шарко-Лейдена). Стінки бронхів набрякають та інфільтруються запальними клітинами, залози і пучки непосмугованих м'язів стінок бронхів гіпертрофуються внаслідок частих нападів бронхоспазму [13, 18]. До інших характерних морфологічних ознак ремоделювання дихальних шляхів, належать: стовщення стінок дихальних шляхів, фіброз суббазальних мембран, посилена васкуляризація підслизового прошарку, метаплазія келихоподібних клітин дихального епітелію [4, 18].

Таким чином, алергічне хронічне запалення, гіперпродукція слизу і ремоделювання нормальної архітектури бронхів – гістопатологічні особливості, що лежать в основі клінічних проявів захворювання. Хронічне запалення характеризується інфільтрацією мононуклеарними клітинами (макрофаги, лімфоцити, плазматичні клітини), руйнуванням тканин, ангиогенезом (проліферацією кровоносних судин малого калібру) та частково фіброзом як спробою загоєння шляхом заміщення ураженої тканини сполучною [23, 24, 25]. Процес ремоделювання включає композицію та реорганізацію кількох клітинних, біохімічних і молекулярних компонентів бронхіальної стінки [15, 25]. Отже, провідну роль в розгортанні запального процесу при БА та розвитку його наслідків виконують компоненти сполучної тканини.

Сполучні тканини – велика група тканин внутрішнього середовища організму, які розвиваються з мезенхіми та представлені різноманітними гістогенетичними рядами клітин [26]. Для всіх видів сполучних тканин визначальним є кількісне переважання міжклітинної речовини, яка відіграє роль наповнювача та метаболічного середовища та наявність волокнистих структур, які представлені колагеновими, ретикулярними та еластичними волокнами [24, 26]. Перебудова усіх різновидів сполучних тканин реалізується шляхом апоптозу та новоутворення клітинних елементів, що супроводжується реорганізацією міжклітинного матриксу [26].

Пухка сполучна тканина – найпоширеніший різновид сполучних тканин, який характеризується різноманітним клітинним складом, незначним вмістом різноспрямованих волокон і відносно великим об'ємом основної міжклітинної

речовини. Ця тканина міститься в усіх органах людини і тварин: формує строму органів, забезпечує трофіку і підтримку їх цілісності, заповнює простори між структурно-функціональними елементами інших тканин, супроводжує нерви і кровоносні та лімфатичні судини, входить до складу шкіри, власної пластинки слизової оболонки та підслизового прошарку органів травного тракту, повітроносних і сечостатевих шляхів [7, 26].

Клітинні елементи пухкої сполучної тканини представлені складною гетерогенною популяцією морфологічно та функціонально спеціалізованих клітин, серед яких розрізняють: фібробласти, фіброцити, міофібробласти, макрофагоцити, мастоцити, плазмоцити, ендотеліоцити, перицити та адвентиційні клітини, ретикулярні клітини, адипоцити, пігментоцити, а також нейтрофіли, еозинофіли та лімфоцити, що мігрували у сполучну тканину із судин мікроциркуляторного русла [26].

Серед різних фенотипів клітин можна визначити деякі ключові клітини, які беруть участь в ініціації морфологічних змін легень при алергічному запаленні, а саме мастоцити, фіброцити, фібробласти [25]. Вони реалізують свої функції за участю міжклітинної речовини.

Мастоцити (тканинні базофіли, опасисті клітини) – постійні клітинні елементи пухкої сполучної тканини, дуже поширені у сполучній тканині й беруть участь як у гострих, так і хронічних запальних реакціях [24]. Мастоцити локалізуються переважно за ходом судин мікроциркулярного русла, нервів [23]. Особливо численні мастоцити у власній пластинці слизових оболонок травної, дихальної й сечостатевої систем, стромі молочних залоз і тимуса, дермі шкіри. Ці клітини утворюються із попередників у кістковому мозку. Вони багато в чому схожі на базофіли (базофільні лейкоцити), але не походять від них, є резидентами в тканинах остаточної диференціації вони проходять у сполучній тканині і тому при запальних реакціях відіграють важливішу роль, ніж базофіли [24]. Тривалість їхнього життя складає від кількох тижнів до кількох місяців. Кількість мастоцитів змінюється залежно від фізіологічного стану організму. Зокрема, вона зростає при підвищенні функціональної активності органів: у матці при вагітності, при

гіперфункції щитоподібної залози, в лактуючій молочній залозі, в шлунку, кишці, печінці - при травленні [26, 27]. Маститими виконують низку важливих функцій: регуляцію гомеостазу сполучної тканини та підтримання балансу рідини в тканинах; запобігання згортанню крові; беруть участь у запальних, імунних та алергічних реакціях [26].

Мастоцити – клітини округлої форми; нерівна поверхня з виростами свідчить про їхню здатність до амебоїдних рухів. Ядра порівняно невеликі, зазвичай округлої або овальної форми зі щільно упакованим хроматином. Цитоплазма містить помірно розвинені органели, елементи цитоскелета, ліпідні краплі, заповнена специфічними електронно-щільними гранулами. Гранули мастоцитів забарвлюються метакроматично, подібно до базофілів крові, містять низку біологічно активних речовин: гістамін, гепарин (антикоагулянт, імуномодулятор і стабілізатор гістаміну), дофамін, а також хемотаксичні фактори еозинофілів і нейтрофілів, хондроїтинсульфати, гіалуронову кислоту, метаболіти арахідонової кислоти, протеази та інші ферменти (трипази, хімази, карбоксипептидаза А), глікопротеїни та фосфоліпіди [26, 28]. Ці речовини є потужними медіаторами запалення, що діють на судинну систему, гладка мускулатура, сполучна тканина, слизові залози та запальні клітини [29]. Гістамін, що міститься в гранулах мастоцитів, викликає швидковазодилатацію кровоносних капілярів і підвищення їхньої проникності, що проявляється у розвитку локальних набряків тканин, і посиленні експреси адгезійних молекул на ендотеліоцитах [26, 28]. Має виражену гіпотензивну дію, стимулює секрецію слизу, бронхоспазм і є важливим медіатором запалення. Дія гістаміну реалізується за рахунок впливу на гладкі м'язи, ендотелій і нервові волокна [26]. Гепарин зв'язує циркулюючий в крові антитромбін III, різко знижуючи цим здатність крові до згортання, зменшує проникність міжклітинної речовини, має протизапальний вплив [26, 29].

З огляду того, що тучні клітини локалізуються в сполучній тканині, вони зазвичай не циркулюють у кровотоці [29]. Мастоцити, індуковані запальними подразниками, мігрують до місця призначення і виявляються в кровообігу. Висока

частота циркулюючих тучних клітин може відображати поточні патологічні зміни при алергічному запаленні [12].

Тучні клітини відіграють центральну роль у запальних та алергічних реакціях негайного типу [29]. Тучні клітини (й базофіли) експресують на своїй поверхні рецептор FcεRI, який зв'язує Fc-фрагмент антитіла IgE. При реакціях гіперчутливості негайного типу IgE, зв'язаний із Fc-рецепторами тучних клітин, специфічно розпізнає антиген, що супроводжується активацією мастоцитів та екзоцитозом гранул та вивільнюють медіатори, такі як гістамін і простагландини тощо [24, 26]. Така дегрануляція називається специфічною [28]. Клінічними проявами масивної дегрануляції мастоцитів є бронхоспазм, гострий риніт, набряки, шкірне свербіння, падіння кров'яного тиску аж до анафілактичного шоку і смерті [26, 30].

Тучні клітини беруть участь як у адаптивних так і у вроджених імунних відповідях на алергени [25]. Можлива неспецифічна дегрануляція, для якої не потрібна взаємодія антитіла і антигену (наприклад, під впливом холоду). Варто зазначити, що процес дегрануляції базофільних клітин є цілком природним і відбувається практично при будь-якому запальному процесі [28, 31]. Збільшення кількості мастоцитів ідентифікується і при пухлинних захворюваннях та хронічних запальних процесах, оскільки вони секретують велику кількість цитокінів і можуть зумовлювати запальну реакцію [24, 26].

Мастоцити та їх медіатори беруть участь у патогенезі БА і алергічного запалення в дихальних шляхах [12]. Кількість тканинних базофілів підвищена в легенях астматиків [29]. При алергічній астмі мастоцити активуються головним чином через IgE-опосередковану дію при зв'язуванні високоафінного рецептора IgE (FcεRI) з алергенами. Але також можуть бути активовані численними іншими стимулами, напр. toll-подібними рецепторами і пов'язаним з ним MAS G-білковим рецептором X2. Мастоцити, розташовані в різних компартментах легень та дихальні шляхів, мають різні характеристики та експресують різні медіатори [12]. Два фенотипи тучних клітин були вивчені в легенях людини та дрібних ссавців: тучні клітини слизової оболонки (синтезують лише триптазу) і периваскулярні

тучні клітини (синтезують триптазу, хімазу та карбоксипептидазу), з переважанням останніх. Попередні дослідження виявили гіперплазію обох фенотипів тучних клітин у легенях людини з розвитком алергічного запального процесу [32].

Мастоцити сприяють підтриманню хронічного алергічного запального процесу дихальних шляхів і відіграють центральну роль в ініціації імунної відповіді на алерген, під час якої вони передають сигнали, які стимулюють синтез IgE плазматичними клітинами і диференціювання Th2-лімфоцитів [25, 33]. Накопичення огрядних клітин у певних ділянках алергічної легені, ймовірно, має відношення до фенотипу астми, її тяжкості і прогресування. Отже, тучні клітини є ключовими гравцями в астматичній відповіді через секрецію безлічі медіаторів [12].

Міжклітинна речовина забезпечує архітектоніку, фізико-хімічні та механічні властивості сполучних тканин, створює оптимальне мікрооточення для життєдіяльності клітин. Вона об'єднує клітини в єдину систему і регулює їхні функції (проліферацію, диференціацію, синтетичну і секреторну активність, рух)[26]. Міжклітинна речовина становить значну частку будь-якої тканини і представлена волокнистими структурами і основною речовиною, які утворюються завдяки діяльності клітинних елементів.

У складі сполучних тканин розрізняють три основних типи волокон, а саме: колагенові, еластичні та ретикулярні. [26, 28].

Колагенові волокна характеризуються високою міцністю і незначною здатністю до розтягу. Вони не галузяться, мають різну товщину і у нативному стані – білий колір. Колагенові волокна забезпечують високі механічні властивості; визначають архітектоніку сполучних тканин; створюють середовище для взаємодії між клітинами і міжклітинною речовиною; впливають на проліферацію, диференціацію, функціональну активність та міграцію клітин. Волокна складаються з двох компонентів: фібрилярного білка колагену та глікозаміногліканів [26]. Колаген – найбільш поширений у тваринному світі білок, який формує опорну позаклітинну сітку для всіх багатоклітинних організмів. Усі типи колагену утворені з потрійної спіралі, яка має вигляд трьох поліпептидних α -

ланцюгів. Близько 30 α -ланцюгів формують понад 20 типів колагену, які по-різному розподіляються в органах і тканинах. Деякі з типів колагену (I, III, V) утворюють фібрилярні волокна. Інші, наприклад IV типу, входять до складу базальної мембрани. Інтерстиціальні колагени являють собою основний компонент всієї сполучної тканини в ранах, що загоюються, а також у рубцях [23, 26]. Колаген продукують клітини різних видів сполучних тканин, в тому числі і фібробласти [26, 34]. Під електронним мікроскопом колагенові волокна мають характерну поперечну посмугованість (чергування електронно-щільних та електронно-прозорих ділянок з періодичністю 67 нм), виникнення якої зумовлене впорядкованим розташуванням поліпептидних ланцюгів у молекулі колагену та амінокислот у ланцюгах [26, 35].

Еластичні волокна мають варіабельну товщину, галузяться, анастомозують одне з одним, утворюючи тривимірні сітки. Еластичні волокна присутні в органах, що піддаються деформації і змінюють форму під дією фізичного навантаження: еластичному хрящі, шкірі, легенях, кровоносних судинах. Еластичні волокна сполучних тканин визначають архітектоніку міжклітинної речовини і забезпечують здатність тканин повертатись до початкової форми після припинення дії навантаження [26, 34]. Вони утворені трьома білками – еластином, фібриліном і еміліном. Головний аморфний компонент еластичних волокон – еластин, гідрофобний неглікозований нерозчинний білок. Представлений молекулами, що мають у стані спокою форму скручених ниток, які при розтягуванні розправляються, а після припинення дії навантаження – знову скручуються. Еластин синтезують фібробласти, гладкі міоцити, хондробласти та хондроцити [23, 26]. Фібрилін – фібрилярний компонент еластичних волокон. Емілін – глікопротеїн міжклітинного матриксу, який забезпечує зв'язування фібрилінових мікрофібрил з аморфним компонентом еластичних волокон. Зріле еластичне волокно організоване таким чином, що центральна його частина представлена аморфним компонентом (молекулами еластину), а периферична - фібрилярною сіткою (мікрофібрилами) [26].

Ретикулярні волокна – продукт синтетичної діяльності ретикулярних клітин. Побудовані з колагену III типу та неколагенових компонентів, формують підтримувальний каркас для клітин. Входять до складу ретикулярної тканини і виявляються при імпрегнації солями срібла, тому їх відносять до аргірофільних волокон. Основна функція ретикулярних волокон – опорна. Найкраще розвинена сітка ретикулярних волокон у лімфатичних вузлах, селезінці, печінці [24, 26].

Основна міжклітинна речовина заповнює проміжки між волокнистими структурами і клітинами сполучної тканини, має гелеподібну консистенцію, характеризується базофілією і низькою електронною щільністю. Складається з макромолекулярних комплексів адгезивних глікопротеїнів з протеогліканами і глікозаміногліканами, забезпечує тургор (еластичність) м'яких тканин та ригідність (жорсткість, непіддатливість) архітекtonіки тканини [24, 26, 36].

Протеоглікани утворюють сильно гідратовані гелі, що зумовлюють стійкість до стискання [24]. Протеоглікани складаються з глікозаміногліканів, ковалентно зв'язаних із протеїновим стрижнем. Протеоглікани можуть бути інтегральними (зв'язуючими) мембранними білками, а також модуляторами росту та диференціювання клітин [23]. Окрім запобігання стисканню тканин протеоглікани також слугують резервуарами для секретованих факторів росту (зокрема FGF і HGF). Деякі протеоглікани є невід'ємними білками клітинних оболонок, які беруть участь у проліферації, міграції та адгезії клітин, наприклад, шляхом зв'язування і концентрації факторів росту й хемокінів [24, 36]. Протеоглікани синтезуються у гранулярній ендоплазматичній сітці та елементах комплексу Гольджі фібробластів та хондробластів [26, 37].

Глікозаміноглікани (ГАГ) – гідрофільні полісахариди, до яких належать гіалуронова кислота, хондроїтинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат, гепарансульфат і гепарин [26]. Маючи високий негативний заряд, щільно упаковані сульфатовані цукри притягують катіони (переважно Na^+) та багато молекул води, що утворюють желатиноподібний матрикс з високою пружністю і в'язкістю [24, 26]. Присутність певних типів ГАГ в різних тканинах визначає властивості їх міжклітинної речовини [24, 37].

Адгезивні глікопротеїни складаються з поліпептидних ланцюгів, сполучених з розгалуженими олігосахаридами. Вони забезпечують зв'язування клітин з міжклітинним матриксом, беруть участь в утворенні базальних мембран, формуванні волокон. Розрізняють глікопротеїни, що мають фібрилярну будову (фібронектин, фібрин), та нефібрилярні білки (ламінін, тенасцин) [26, 36].

Гелеподібна консистенція основної речовини дозволяє переміщуватися в ній окремим молекулам і клітинам. Швидкість руху залежить від в'язкості, яка визначається ступенем полімеризації глікозаміногліканів: чим вищий цей ступінь, тим вища в'язкість міжклітинного середовища [26, 37].

Міжклітинна речовина постійно перебудовується; її синтез і деградація супроводжують морфогенез, регенерацію та репарацію тканин, хронічний фіброз. Вона представлена двома основними формами – інтерстиційною тканиною та базальною мембраною [7, 24]. Інтерстиційна тканина наявна у проміжках між клітинами у сполучній тканині, а також між епітелієм паренхіми та глибше розташованими судинами і гладкими м'язовими клітинами. Вона синтезується мезенхімальними клітинами (наприклад, фібробластами), утворюючи аморфний тривимірний гель. Основними складниками інтерстиційної тканини є фібрилярний і нефібрилярний колаген, а також фібронектин, еластин, протеоглікани, гіалуронат та інші структури. Забезпечує депо для різних латентних факторів росту, які можуть активуватися в ураженій ділянці або вогнищі запалення [24, 34].

Базальна мембрана оточує епітеліальні, ендотеліальні і гладком'язові структури. слугує межею між епітелієм і глибше розташованою сполучною тканиною; вона не тільки забезпечує механічне підтримання епітелію, а і функціонує як частина фільтраційного апарату, наприклад у легенях та нирках [23, 24]. Окрім цього, базальні мембрани відіграють важливу роль як субстрат, який сприяє адгезії, міграції і проліферації клітин, а також безпосередньо впливає на клітинну форму, розташування та деякі функції [23]. Базальна мембрана синтезується вищерозташованим епітелієм і нижчерозташованими мезенхімальними клітинами, утворюючи плоску пластинчасту «дрібнокоміркову»

сітку. Основними елементами є аморфний нефібрилярний колаген IV типу та ламінін [24].

Підтримання нормальної структури тканин потребує наявності базальної мембрани та інтерстиційної тканини, цілість цих елементів у паренхіматозних клітинах є дуже важливою для організованої регенерації тканин. Порушення ПКМ призводить до дефектної регенерації та репарації тканин [7, 24].

Фібробласти – найчисленніші клітини пухкої сполучної тканини, які синтезують білки (колаген і еластин), необхідні для побудови волокнистих структур, та інших органічних компонентів основної міжклітинної речовини (глікозаміногліканів, протеогліканів, глікопротеїнів) [26].

Після утворення фібробласти формують складну систему (дифферон) клітин, що відрізняються за ступенем диференціювання, морфологічним і функціональним характеристикам. Крім власне фібробластів в дифферон входять адипоцити, фіброкласти, фіброцити (що являють собою кінцеву стадію диференціювання фібробластів), міофібробласти, що є т.з. активованою формою фібробластів, та деякі інші клітини, спорідненість яких з фібробластами залишається спірною (наприклад, перицити) [26, 38].

До функцій фібробластів належать: продукція компонентів міжклітинної речовини, підтримка її структурної організації та хімічного гомеостазу; регуляція діяльності інших клітинних елементів сполучної тканин і вплив на інші тканини. [26]. Вони беруть участь в імунних відповідях, виявляють прозапальні властивості та властивості ремоделювання матриці [39]. Джерелом розвитку фібробластів упродовж ембріогенезу служать клітини мезенхіми. У зрілому організмі цю функцію пов'язують з адвентиційними клітинами, або перицитами, котрі супроводжують гемо- та лімфокапіляри [26, 38].

Зрілий (диференційований) фібробласт – велика клітина (розмір 40-50 мкм) полігональної або веретеноподібної форми з відростками, що характеризується високою синтетичною активністю, рухливістю і здатністю до зміни форми. У складі цитоплазми фібробласта розрізняють внутрішню навколоядерну зону – ендоплазму (містить органели синтетичного апарату, лізосоми, мітохондрії), і

периферичну зону – ектоплазму, яка утворює відростки і заповнена елементами цитоскелета [26, 38]. У периферичній зоні цитоплазми фібробластів локалізуються мікрофіламенти, що містять білки типу актину і міозину. Рух клітин відбувається завдяки зв'язуванню цих білків з опорними фібрилярними структурами за посередництва білка фібронектину, що його синтезують самі фібробласти. Периферична зона фібробласта має незначну товщину, внаслідок чого під світловим мікроскопом краї клітини набувають нечіткого, “розмитого” вигляду. Світле еухроматинізоване ядро фібробласта свідчить про високу інтенсивність у ньому синтетичних процесів [26].

Вони не тільки синтезують і організовують компоненти екстрацелюлярного матрикса дерми, але також взаємодіють один з одним і з іншими типами клітин, відіграючи визначальну роль у регуляції гістофізіології шкіри [40].

Фіброцити – клітини меншого розміру, веретеноподібної форми з довгими відростками та великим щільним ядром; у цитоплазмі містять невелику кількість мітохондрій та слабо розвинений синтетичний апарат. Синтез речовин у фіброцитах різко знижений. Функція цих клітин полягає в регуляції метаболізму і підтримці стабільності міжклітинної речовини. При загоєнні ран фіброцити можуть активуватися, набувати морфологічних ознак фібробластів (ядро округлюється, збільшується кількість ендоплазматичної сітки і мітохондрій) та посилювати синтетичну діяльність. Фіброцити мають тривалий життєвий цикл, не здатні до розмноження і є кінцевою формою розвитку фібробластів [26].

Фібробласти відіграють критичну роль у регенерації ушкоджень. Ці клітини притягуються до ділянок рани локальною продукцією факторів росту (цитокінів), таких як фактор росту тромбоцитів. Перша хвиля фібробластів проникає в ділянку рани по ходу судин, що врастають. Ці клітини диференціюються в спеціалізований, але функціонально динамічний і тимчасовий тип клітин – так звані міофібробласти [40]. Міофібробласти – клітини, які за будовою і функціями займають проміжне положення між фібробластами і гладкими міоцитами. Морфологічно для міофібробластів характерні зірчаста форма і активне ядро. У цитоплазмі містять добре розвинену гранулярну ендоплазматичну сітку і комплекс

Гольджі. Особливістю цих клітин є значний ступінь розвитку та організація цитоскелета, представленого пучками паралельно орієнтованих мікрофіламентів, що отримали назву стресорних волокон. Активація міофібробластів відбувається при пошкодженні сполучної тканини. Вони беруть участь в репаративних процесах: скорочуючись, стягують краї рани та зменшують її розміри, синтезують колаген, який заповнює і зв'язує пошкоджені ділянки тканин. У зв'язку зі згаданими функціями, міофібробласти виявляються в молодій регенеруючій тканині, рубцях, у вогнищах запалення. Джерелом утворення міофібробластів служать фібробласти та перицити [26]. Міофібробласти зникають з ділянки ушкодження, очевидно, за рахунок апоптозу, і згодом замінюються другою хвилею фібробластів, що ініціюють формування колагенового матриксу [40].

Хронічне алергічне запалення, що спостерігається при БА, характеризується активацією фібробластів/міофібробластів, що в кінцевому підсумку призводить до ремоделювання легень та прогресуючої втрати легеневої паренхіми [41].

У хворих на астму, які отримують адекватне лікування, кількість фіброцитів дуже низька і порівнянна з такою у здорових людей [39].

При атопічній астмі кожен контакт з алергеном може викликати подальше збільшення щільності фібробластів і міофібробластів в субепітеліальній зоні протягом 24 годин [15]. У цих пацієнтів транзиторне збільшення кількості фіброцитів у периферичній крові та дихальних шляхах відбувається разом із посиленням запалення бронхів і відображає погіршення захворювання та потребу в більш інтенсивному лікуванні [39].

Щільність фібробластів і міофібробластів особливо підвищена в слизовій бронхів у пацієнтів з найважчими формами хронічної персистуючої астми, при хронічно недостатньому лікуванні або резистентній до кортикостероїдів астмі та пов'язана зі стійким запаленням дихальних шляхів і поточним ремоделюванням бронхіальної стінки [15]. Астматичний бронхіальний епітелій є основним джерелом хемоаттрактантів фіброцитів при астмі та разом із Т-хелперними лімфоцитами 2 типу та еозинофілами сприяє проліферації та функції про-ремоделювання рекрутованих фіброцитів. Наявність підвищеної кількості фіброцитів у слизовій

оболонці бронхів у хворих на алергію з нелікованою або резистентною астмою також може підвищити ризик гострих загострень, оскільки ці клітини можуть посилювати запалення, спричинене лімфоцитами-хелперами типу 2, під час кожного контакту з клінічно значущим алергеном, вивільняючи додаткові прозапальні фактори [39].

Накопичення міофібробластів у слизовій оболонці бронхів хворих на астму також збільшує масу скоротливих клітин у стінці бронхів і може сприяти посиленню аномального звуження бронхів, особливо в тих випадках, коли воно поєднується з гіпертрофією і гіперплазією підлеглого гладком'язового шару [15].

Отже, алергічне запалення дихальних шляхів при БА поступово приводить до заміщення легеневої паренхіми сполучною тканиною з відповідними клінічними проявами та розвитком ускладнень. Однак основні гістопатофізіологічні механізми, відповідальні за ці процеси, є складними та багатогранними, включають різноманітні клітинні фенотипи та цитокіни. Крім того, активність і вплив кожного клітинного і молекулярного компонента значно варіюється в різних індивідів і може змінюватися з часом, реакцією на медикаментозну терапію та під впливом навколишнього середовища. Тому надзвичайно важливо вивчати гістофізіологію алергічного запального процесу для кращого розуміння та пошуку можливостей для блокування як стійкого запалення, так і фіброзу дихальних шляхів при БА [25, 39].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом експериментального дослідження були легені, котрі вилучені від 48 статевозрілих самців морської свинки масою 450 – 600 г, які утримувались у стандартних умовах віварію Запорізького державного медичного університету. Усі маніпуляції проводили з дотриманням основних принципів роботи з експериментальними тваринами відповідно до положення Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006).

Індукція алергічного запалення дихальних шляхів здійснювалась шляхом підшкірної сенсibiliзації та наступної інгаляції овальбуміном (ОВА) [37]. На 1, 7, 14 день експерименту морським свинкам проводилась сенсibiliзація – підшкірне введення в міжлопаткову ділянку 0,5 мг овальбуміну (Sigma Chemical Co., США) разом з ад'ювантом - гідроокисом алюмінію, 10 мг (AlumVax Hydroxide vaccine adjuvant, OZ Biosciences Франція), розведених в 1 мл фізіологічного розчину. З 21 по 28 день експерименту тваринам здійснювалась інгаляція ОВА в дозі 10 мг/мл фізіологічного розчину протягом 15 хв/добу за допомогою компресорного інгалятора LD-211C (Little Doctor International, Сингапур) в інгаляційній камері. Для проведення дослідження тварини були розподілені на 6 груп (по 8 тварин у кожній групі). Перші чотири групи це тварини, сенсibiliзовані та аероалергізовані ОВА, виведені з експерименту відповідно на 23-ю, 30-ю, 36-ю і 44-ю добу після його початку; 5 - контрольна група, тваринам якої вводили підшкірно 1 мл фізіологічного розчину та проводили інгаляцію фізіологічним розчином; 6 – інтактна група. З метою раціональної подачі одержаних даних і їх інтерпретації умовно виділяємо ранній (23-тя, 30-а доби експерименту) та пізній (36-а і 44-а доби після початку експерименту) періоди розвитку алергічного запального процесу в легенях.

Тварин виводили з експерименту шляхом передозування тіопенталового наркозу згідно встановлених термінів (23-ю, 30-у, 36-у і 44-у доби експерименту). Гістологічні зрізи забарвлювали альціановим синім з критичною концентрацією $MgCl_2$ 0,2М для визначення динаміки розподілу мастоцитів та їх морфометричного дослідження [15]. Морфологічне дослідження отриманих зрізів проводили за допомогою світлового мікроскопа Primo Star (Zeiss, Німеччина) із системою фотодокументування. Підраховували середню кількість мастоцитів слизових оболонок внутрішньолегеневих дихальних шляхів і навколосудинних мастоцитів, фіброцитів, фібробластів та їх співвідношення – фібробластно-фіброцитарний коефіцієнт на умовну одиницю площі $5000 \mu m^2$.

Для визначення динаміки розподілу глікозаміногліканів та морфометричного дослідження клітин гістогенного диферону сполучної тканини зрізи забарвлювали альціановим синім з критичною концентрацією $MgCl_2$ 0,2М. З метою оцінки накопичення глікогену і PAS-позитивних нейтральних глікопротеїнів зрізи забарвлювали за допомогою PAS-реакції з обробкою і без обробки амілазою слини з дозabarвленням ядер гематоксилином [42, 43]. Облік результатів забарвлення гістохімічного виявлення глікогену і нейтральних глікопротеїнів проводили за наступною схемою: ++++ – темно-червоне, +++ – червоне, ++ – рожеве, + – блідо-рожеве, 0 – відсутність реакції. Мікроскопічним методом вивчали гістохімічні відмінності позаклітинного матриксу дихальної слизової та адвентиційної оболонок внутрішньолегеневих дихальних шляхів, ШИК позитивних клітин легеневих комірок та міжкоміркових перегородок, легеневого інтерстицію[44].

Для проведення електронної мікроскопії шматочки тканини легень морської свинки завтовшки 1×1 мм відразу ж після вилучення фіксували у 2,5 % розчині глутаральдегіду з подальшою обробкою в 1 % розчині тетраоксиду осмію. Надалі шматочки проводили по висхідній батареї спиртів до 100 % спирту, ацетон з додатковим контрастуванням протягом двох годин в 2,5 % уранілацетат на 700 С. Заливку в блок здійснювали поступовим просочуванням тканини окисом ацетону з епоном (2:1; 1:1; 1:2) і заливали в чистий епон. Полімеризацію смол проводили в два етапи при $36^\circ C$ (12 годин) і $56^\circ C$ (24 години). На ультратомі «PowerTome RMC

Воескелер» отримували напівтонкі (1–2 μm) і ультратонкі (55–65 nm) зрізи. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом протягом 25 хвилин при кімнатній температурі. Ультратонкі зрізи вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-100-01 при прискорюючій напрузі 65 кВ. Електронномікроскопічним методом вивчали ультраструктурні особливості мастоцитів, кровоносних капілярів у сполучній тканині легень[45].

Результати досліджень оброблені сучасними статистичними методами аналізу на персональному комп'ютері з використанням стандартного пакета програм Microsoft Office 2010 (Microsoft Excel) та «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія 46 № AXXR712D833214FAN5) на базі операційної системи Windows 10, а також за допомогою бібліотек NumPy (BSD License), SciPy (BSD License), pandas (BSD License), pandas-profiling (MIT License), для візуалізації оброблених даних використовували бібліотеку matplotlib (BSD License) для мови програмування Python [15, 34].

Гіпотезу про нормальність розподілу досліджуваних показників перевіряли з використанням критерію Шапіро-Уїлка та критерію узгодженості Колмогорова – Смирнова. Для перевірки гіпотези про приналежність двох незалежних вибірок одному закону розподілу використовували критерій однорідності Колмогорова – Смирнова. Розраховували середні арифметичні (M) та стандартні похибки середньої ($\pm m$). Статистичну значимість міжгрупових відмінностей за отриманими даними встановлювали за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента (*) та непараметричного U-критерію Уїтні-Манна (p^{**}). Отримані показники порівнювались між медіаною і міжквартильним розмахом Me ($Q1; Q3$) [15]. Статистично значущими вважали відмінності між порівнюваними значеннями на рівні 95% ($p < 0.05$).

РОЗДІЛ 3

Морфологічні зміни компонентів сполучної тканини легень морських свинок в динаміці алергічного запалення

3.1 Мастоцити слизових оболонок, навколосудинні мастоцити та кровоносні капіляри в легенях морських свинок за умов сенсibilізації овальбуміном

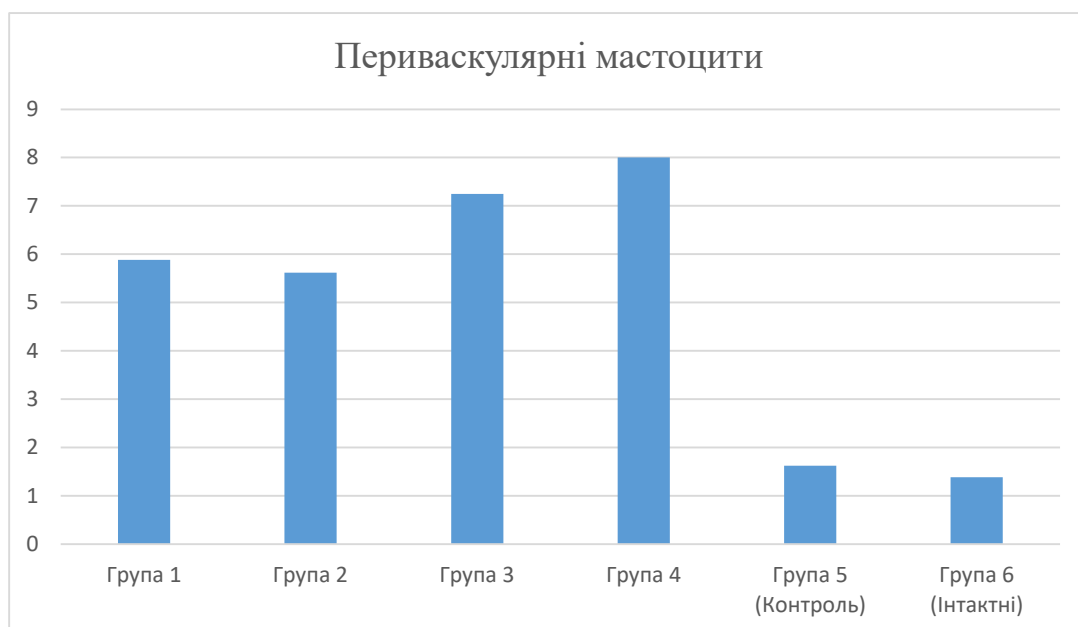
В ході проведених досліджень виявлено, що у морських свинок інтактної групи у навколосудинних ділянках дихальних шляхів на 23, 30, 36 і 44 добу від початку експерименту середня кількість периваскулярних мастоцитів складає $1,38 \pm 0,07$ в полі зору, а середня кількість мастоцитів слизової оболонки внутрішньолегеневих бронхів складає $2,62 \pm 0,05$ клітин в полі зору. У тварин контрольної групи, яким вводили підшкірно 1 мл фізіологічного розчину та проводили інгаляцію фізіологічним розчином у ті дні, коли експериментальні групи зазнавали такого ж впливу, але з ОВА, на 23, 30, 36 і 44 добу від початку експерименту, середня кількість мастоцитів легень подібна до такої у тварин інтактної групи, і складає $1,62 \pm 0,37$ та $2,75 \pm 0,05$ відповідно.

Таким чином, у тварин інтактної та контрольної груп вміст навколосудинних мастоцитів та мастоцитів слизової оболонки морських свинок статистично значимо не відрізнявся ($p > 0.05$), що означає відсутність впливу маніпуляцій під час експерименту на розвиток гіперплазії тканинних базофілів. Тому порівняння дослідних груп вирішено було проводити з результатами контрольної групи.

Дослідження динаміки кількісних змін мастоцитів тварин, яким проводилась сенсibilізація та інгаляційне введення ОВА, показало збільшення цих клітин внаслідок активної участі у реакції гіперчутливості. При цьому відзначається більш швидке наростання кількості периваскулярних тучних клітин, особливо на ранньому періоді експерименту. Збільшення кількості тучних клітин обох фенотипів визначається у тварин 1-ї дослідної групи з 23-ї доби спостереження в ранній період розвитку експериментального алергічного запалення, але більш суттєві ОВА-провокаційні ефекти впливають на кількість периваскулярних тучних клітин. Крім того, подальша динаміка зміни їх кількості неоднакова в різних

експериментальних групах. Зміни кількості периваскулярних мастоцитів на 23, 30, 36 і 44 добу від початку експерименту відображені на рисунку 3.1.1.

Рис. 3.1.1 Морфометричні зміни кількості периваскулярних мастоцитів

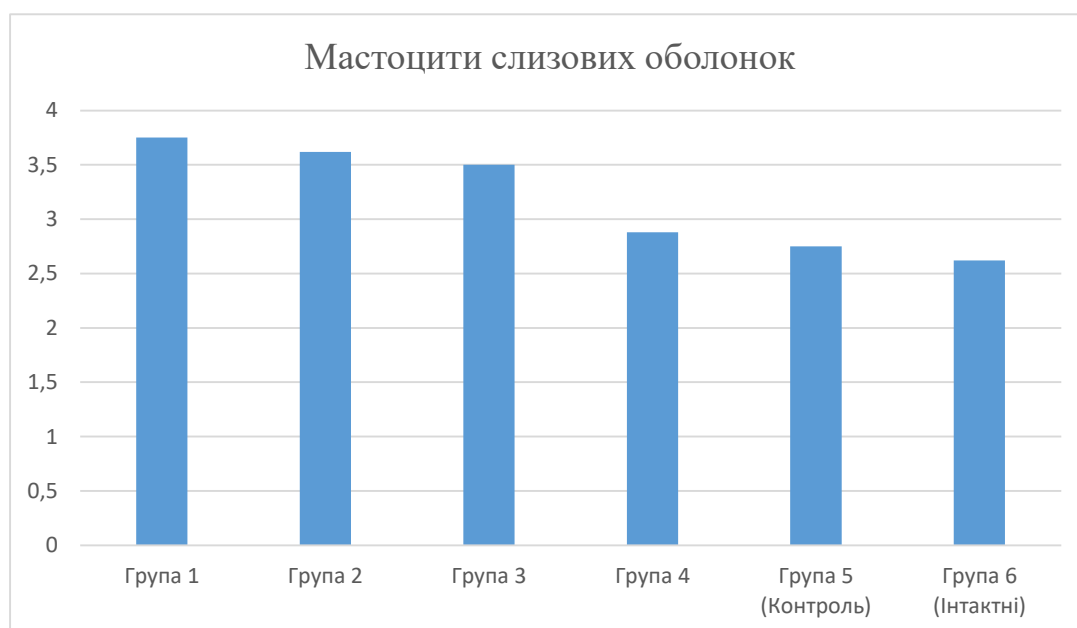


дихальних шляхів морської свинки порівняно з контрольною групою ($M \pm m$, $n=8$).

Максимальна середня кількість тучних клітин слизової оболонки, що спостерігалася в 1-й дослідній групі, статистично достовірно вища в 1,4 раза порівняно з тваринами контрольної групи ($p^{*/**} < 0,05$). Подальше дослідження показало, що, починаючи з 30-ї доби експерименту, спостерігається тенденція до їх поступового повернення до показників контрольної групи з досягненням останньої на 44-ту добу спостереження. Середня кількість периваскулярних тучних клітин у тварин 1-ї дослідної групи в 1,6 раза більша порівняно з кількістю тучних клітин слизової оболонки та статистично достовірно в 3,6 раза порівняно з контрольною групою ($p^{*/**} < 0,05$). Спостерігається тенденція до збільшення кількості периваскулярних тучних клітин з максимальною швидкістю на 44 добу спостереження, починаючи з 36 доби експерименту. На 30-ту добу спостереження середня кількість тучних клітин слизової оболонки в полі зору становить $3,62 \pm 0,05$, що в 1,3 раза більше аналогічного показника в контрольній групі ($p^{*/**} < 0,05$).

Проте середня кількість периваскулярних тучних клітин у тварин 2-ї дослідної групи на 30-ту добу спостереження в 1,5 раза перевищує кількість пов'язаних із слизовою оболонкою тучних клітин, а порівняно з тим же моментом у 2-й дослідній групі – статистично достовірно в 3,5 рази. контрольна група ($p^{*/**}<0,05$). Встановлено зміни динаміки тучних клітин обох фенотипів у пізній період розвитку експериментального алергічного запалення в легенях морської свинки. Середня кількість тучних клітин слизової оболонки у тварин 3-ї дослідної групи становить $3,5\pm 0,05$ у полі зору, що статистично достовірно в 1,3 рази вище ($p^{**}<0,05$), порівняно з таким же показником контролю. група. Середня кількість тучних клітин слизової оболонки набуває контрольного показника на 44 добу досліді (рис. 3.1.2).

Рис. 3.1.2 Морфометричні зміни кількості мастоцитів слизових оболонок



дихальних шляхів морської свинки порівняно з контрольною групою ($M\pm m, n=8$).

Середня кількість периваскулярних тучних клітин у тварин 3-ї дослідної групи на 36-ту добу спостереження в 2 рази більша порівняно з кількістю пов'язаних із слизовою оболонкою тучних клітин, а статистично вірогідно – у 4,5 рази. разів порівняно з тією ж точкою в контрольній групі ($p^{*/**}<0,05$). У тварин 4-ї дослідної групи на 44-ту добу від початку досліді виявлено гіперплазію

периваскулярних тучних клітин (рис. 3) ($8,0 \pm 0,29$ в полі зору), що статистично достовірно в 5 разів перевищує у контрольній групі ($p^{*/**} < 0,05$).

Максимальний приріст середньої кількості периваскулярних мастоцитів на 44-ту добу експерименту досяг $8,0 \pm 0,29$ клітин в полі зору, що достовірно перевищує результати контрольної групи в 4,9 рази ($p^{*/**} < 0,01$).

Гістологічна та гістохімічна оцінка легень морських свинок після експериментальної сенсibiliзації овальбуміном виявила комплекс реактивних змін сполучної тканини дихальних шляхів. Виявлено гіперплазію бокалоподібних епітеліоцитів з ознаками розтягнення, переповнення слизом. Апікальні поверхні клітин витинаються в просвіт легневих комірок (рис. 3.1.3).

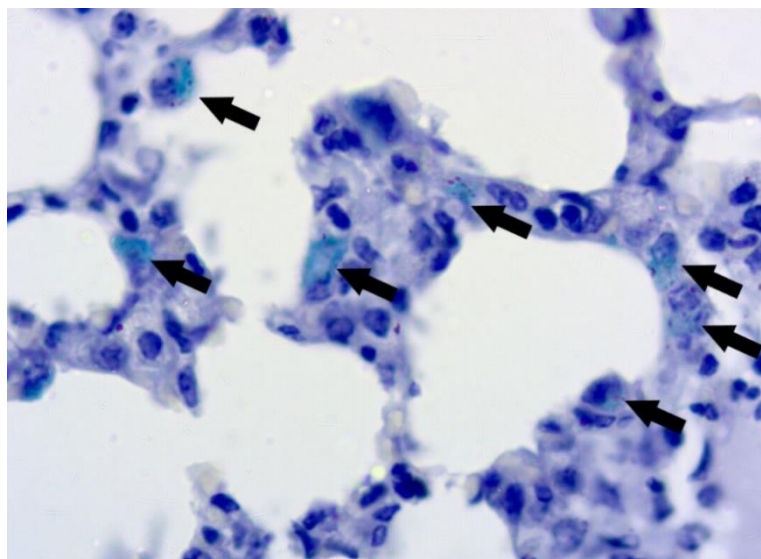


Рисунок 3.1.3 – Гіперплазія навколосудинних мастоцитів (показані стрілками) міжкоміркових перегородок легень морської свинки 4-ої експериментальної групи (44-та доба після початку експеримента).

Забарвлення альціановим синім. Зб. $\times 1000$.

При ультрамікроскопічному дослідженні цитоплазма мастоцитів містить великі темні секреторні гранули, розташовані досить рясно, але на невеликій відстані одна від одної. Кількість гранул дещо більша у сенсibiliзованих ОВА тварин, що може характеризувати підвищення їх активності та високий

функціональний потенціал (рис. 3.1.4). Деякі тканні базофіли містили знижене число гранул, що свідчить про їх дегрануляцію.

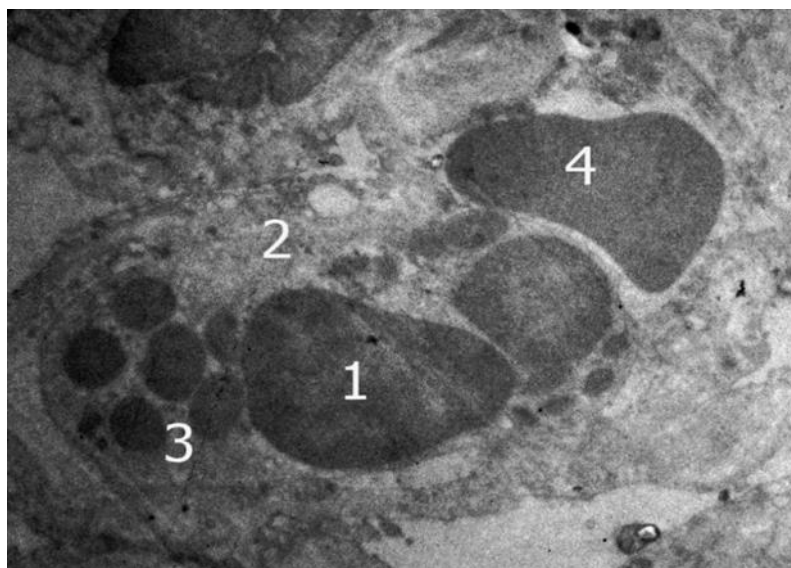


Рисунок 3.1.4 – Навколосудинний мастоцит в легені морської свинки. 3-тя експериментальна група (36-та доба після початку експерименту). 1 – ядро; 2 – цитоплазма; 3 – базофільні гранули; 4 – еритроцит в просвіті кровоносного капіляра. Електронограма. $\times 2200$.

Електронно-мікроскопічне та світлооптичне дослідження вже на ранньому етапі дослідження виявило також зміни судин мікроциркуляторного русла: розширення, помірний набряк власної пластинки, що супроводжувалось набуханням ендотеліоцитів капілярів і збільшенням їх ядер, агрегацією хроматину в центрі ядра та примембранної зоні, зменшення об'ємної щільності мікропіноцитозних везикул (МПВ). На люмінальній поверхні ендотеліоцитів навпаки виявлялось збільшення кількості МПВ та цитоплазматичних виростів.

Розширення судин мікроциркуляторного русла супроводжувалось повнокрів'ям, нерідко з морфологічними ознаками стазу, складжу еритроцитів і тромбозу (рис. 3.1.5). Ступінь вираження змін зростав в міру зменшення калібру судин, досягаючи максимуму в капілярах перегородок комірок легень. Зміни судин мікроциркуляторного русла супроводжувались розволокненням колагенових волокон, їх потовщенням та ущільненням. У деяких ділянках відзначалося

звуження просвіту капілярів у зв'язку з вираженим периваскулярним фіброзом. Стінки судин мали ознаки стоншення, нерідко розриви. У периваскулярній зоні візуалізувались скупчення лімфоцитів, еозинофіли, активні клітинні форми макрофагів.

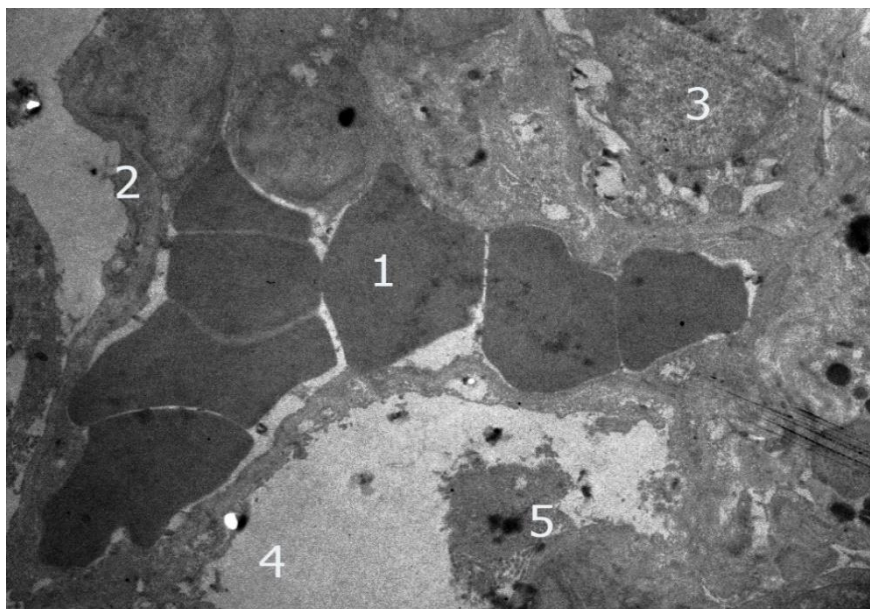


Рисунок 3.1.5 – Кровоносний капіляр міжкоміркової перегородки респіраторного відділу легені морської свинки. 2-га експериментальна група (30-та доба після початку експерименту). 1 – деформований еритроцит в просвіті кровоносного капіляру; 2 – альвеолоцит I типу; 3 – альвеолоцит II типу; 4 – просвіт легеневої комірочки; 5 – фрагмент цитоплазми коміркового макрофагоцита. Електроннограма. Зб. $\times 6000$.

Власна пластинка слизової оболонки бронхів в тварин контрольної групи представлена пухкою волокнистою сполучною тканиною з невеликою кількістю капілярів. Ультраструктурне дослідження показало, що капіляри слизової оболонки бронхів вистелені ендотеліоцитами типової будови, на люмінальній поверхні яких визначалися поодинокі МПВ, в цитоплазмі поодинокі секреторні гранули.

Отже спостерігається збільшення та подальший розвиток алергічного запалення дихальних шляхів морських свинок навіть після припинення дії

алергену. Нормалізації та відновлення розмірів просвіту мікросудин дихальних шляхів також не визначається.

3.2 Гістохімічні особливості розподілу PAS-позитивного матеріалу в стінці дихальних шляхів і в респіраторному відділі легень

При вивченні зрізів виявлено, що у морських свинок інтактної групи гістологічна структура легень на 23, 30, 36 і 44 добу від початку експерименту суттєво не відрізняється і має властиву для цього органу будову. Сполучна тканина периваскулярної та перибронхіальної ділянок легень морських свинок при гістохімічному аналізі показала слабкопозитивну (+) PAS-реакцію, що свідчить про низький вміст нейтральних глікопротеїнів; при цьому більшість PAS-позитивного матеріалу розташована позаклітинно (рис. 3.2.1).

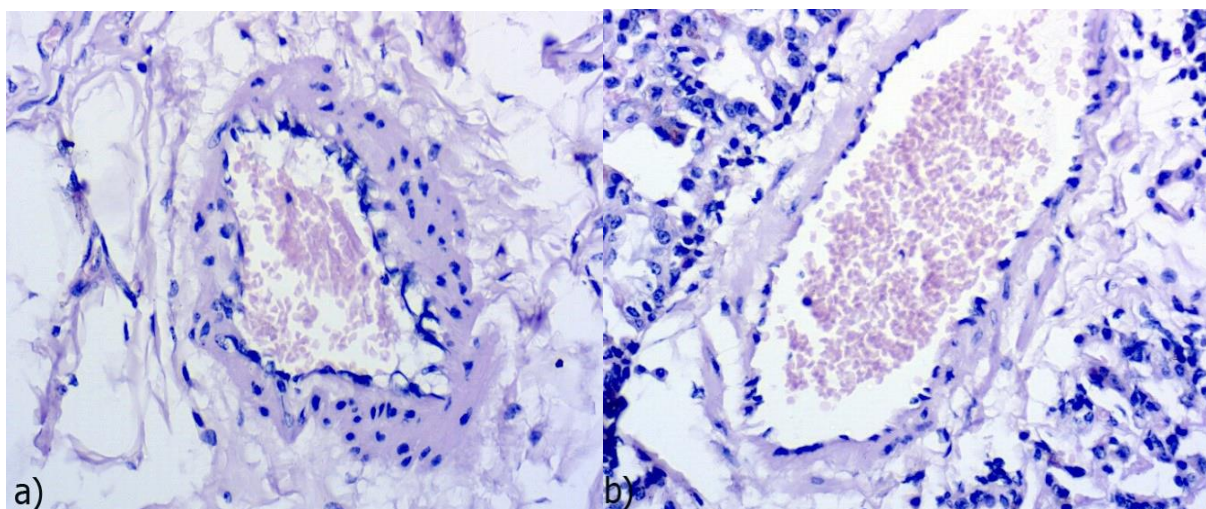


Рисунок 3.2.1 – Слабкопозитивна (+) PAS – реакція навколосудинної сполучної тканини легеневого інтерстицію морської свинки.

Контрольна група. 3.2.1a – артеріола; 3.2.1b – венула.

Забарвлення PAS – реакція. 3б. $\times 400$.

Гістохімічний аналіз легень морських свинок дослідних груп експерименту виявив збільшення PAS-позитивних речовин внаслідок розвитку ОВА-індукованого алергічного запалення. Відомо, що PAS-реакція найчастіше використовується для візуалізації присутності глікогену, але й також для

глікопротеїнів та полісахаридів. З переліку тканин, що можуть давати позитивну реакцію PAS, базова позаклітинна субстанція сполучних тканин містить позаклітинні білки, більшість з яких є глікопротеїнами, що беруть участь у зв'язуванні клітин з міжклітинним матриксом та формуванні волокон; велика кількість PAS-позитивних речовин входить до складу секрету слизових бокалоподібних клітин легень.

На ранньому етапі експерименту було виявлено значно більш інтенсивне фарбування (+++) під час PAS-реакції, порівняно з контрольною та інтактною групами, у поверхневому слизі дихального епітелію бронхів та на поверхні слизової оболонки бронхів. Також спостерігалось потовщення слизової оболонки та адвентиційної оболонки бронхів, що складається із пухкої волокнистої сполучної тканини. Значне накопичення PAS-позитивних речовин в адвентиційній оболонці спостерігалось в 1-ій групі (+++) порівняно з групою контролю (+) та інтактною групою (+) що привело до потовщення адвентиційної оболонки за рахунок збільшення відносного об'єму пухкої сполучної тканини, що є наслідком реакції компонентів сполучної тканини на алергічне запалення. В цей час також спостерігається інтенсивна дифузна та вогнищева інфільтрація лімфоцитами та еозинофілами у власній пластинці слизової оболонки; ці клітини виробляють активні речовини, що сприяють подальшому розгортанню гіпертрофічних процесів у позаклітинній речовині.

Наслідком процесу алергічного запалення тканин дихальних шляхів, викликаного сенсibiliзацією та алергізацією овалбуміном, є поступове збільшення на ранньому етапі експерименту кількості келихоподібних клітин, що містять PAS-позитивний слизовий секрет. Істотне підвищення функціональної активності келихоподібних епітеліоцитів дихального епітелію внутрішньолегеневих бронхів виявлено у 3 групі тварин на 36 добу експерименту (++++) в порівнянні з контрольною групою (++). При цьому клітини були збільшені в об'ємі, з морфологічними ознаками гіперсекреції (табл. 3.2.1).

Таблиця 3.2.1

Особливості розподілу нейтральних полісахаридів та глікогена в структурах легень морських свинок в нормі та в динаміці експериментального овальбумін-індукованого алергічного запалення

Гру- Па	I		II		III		IV		V	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	++
2	++++	++++	+++	+++	++++	++	+++	+++	++	++
3	+++	++++	++++	+++	+++	+	++	++	++	++
4	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+
5	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
6	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+

Примітки: А – PAS-реакція, В – PAS-реакція з попередньою обробкою амілазою слини; I – поверхневий слиз дихального епітелію бронхів; II – PAS-позитивні келихоподібні клітини дихального епітелію внутрішньолегеневих бронхів; III – PAS-позитивні клітини легневих комірок та міжкоміркових перегородок; IV – позаклітинний матрикс сполучної тканини дихальної слизової та адвентиційної оболонок внутрішньолегневих дихальних шляхів; V – легневий інтерстицій.

Вміст аморфних речовин істотно не змінювався в PAS-позитивних альвеоцитах 2 порядку легневих комірок та міжкоміркових перегородок в порівнянні з контролем внаслідок особливостей функціонування цих клітин, які постійно накопичують глікоген як енергетичний субстрат для інтенсивних біосинтетичних процесів.

У піддослідних тварин на 36 добу від початку експерименту (пізній період розвитку алергічного запального процесу в легенях) зберігається тенденція до більшого вмісту нейтральних полісахаридів і глікопротеїдів у периваскулярній і перибронхіальній сполучній тканині та у поверхневому слизу дихального епітелію

бронхів в експерименті, але слід відзначити зміни розподілу PAS-позитивних речовин на користь внутрішньоклітинного розташування.

Потовщення та ущільнення сполучної тканини слизової оболонки було виявлено у тварин 3-ої та 4-ої груп (++++), порівняно з групою контролю (++) та інтактною групою (++)). Це відбувалось за рахунок збільшення відносної площі пухкої сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки, що свідчить про продовження алергічного запалення в дихальних шляхах після закінчення алергізації. Так, у всіх групах дослідних тварин кількість PAS-позитивних келихоподібних клітин мала тенденцію до збільшення порівняно з контрольними тваринами. На рисунку 3.2.2 звертає на себе увагу збільшення вмісту PAS-позитивних речовин і клітин в епітеліальному покриві слизової оболонки бронхів на 30-ту добу від початку дослідження.

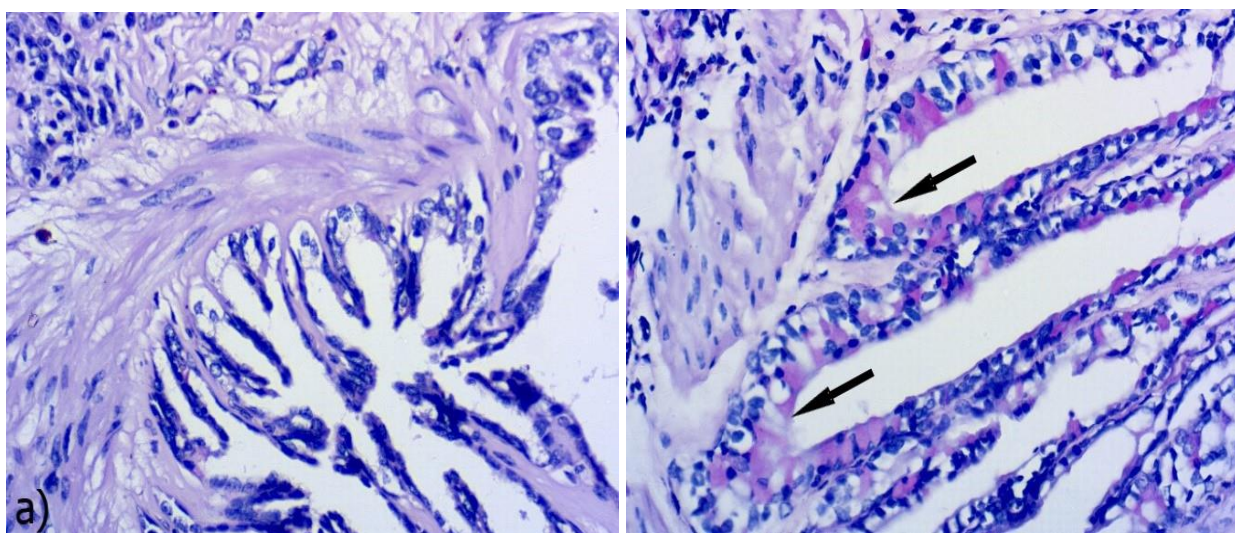


Рисунок 3.2.2 – Бронх середнього калібру в легенях морської свинки інтактної (3.2.2a) та 2-ої експериментальної групи (3.2.2b).

Стрілки вказують на PAS-позитивні келихоподібні клітини.

Забарвлення: PAS – реакція. Зб. $\times 400$.

Дані гістохімічного аналізу свідчать про гіпертрофію та гіперплазію келихоподібних клітин, спостерігається підвищення апікальної частини бокалоподібного епітеліоциту, ознаки гіперсекреції та застою слизу. При

досліджені ультраструктури бокалоподібні клітини містили велику кількість щільно упакованих гранул, що формують великі конгломерати слизу.

Отже, при гістологічному дослідженні легенів морської свинки після сенсibilізації та аероалергізації овальбуміном виявлено статистично підтвержені зміни у розподілі та кількості PAS-позитивного матеріалу. Ці зміни в хронобіологічному аспекті свідчать про утворення колагену та позаклітинного матриксу ще значно тривалий період навіть після припинення дії алергену.

3.3 Морфологічні особливості гістогенного диферону клітин сполучної тканини в легенях морських свинок за умов сенсibilізації овальбуміном

Гістологічна та гістохімічна оцінка легень морських свинок після експериментальної сенсibilізації овальбуміном виявила комплекс реактивних змін клітинного компоненту та позаклітинної речовини сполучної тканини дихальних шляхів. Волокнистий компонент з ознаками набряку та порушення структури, базальна мембрана нерівномірна з значними ділянками потовщення, основна речовина периваскулярної та перибронхіальної сполучної тканини з гіперхромією у порівнянні з контрольною групою, що свідчить про змінені властивості сполучної тканини.

Одночасно відбувається стоншення слизової оболонки, уражується псевдобагатошаровий епітелій бронхів, особливо війчасті епітеліоцити. Спостерігалась їх часткова десквамація у просвіт органу, а місцями і повна їх відсутність.

Потовщення підслизової та адвентиційної оболонок відбувається за рахунок збільшення відносної площі пухкої сполучної тканини, що є наслідком реакції компонентів сполучної тканини дихальних шляхів у відповідь на алергічне запалення при аероалергізації овальбуміном.

Разом з розростанням та ущільненням сполучної тканини в периваскулярних та інтраепітеліальних ділянках легень внаслідок розвитку запального процесу виявлено гіперплазію клітин фібробластичного ряду, які приймають активну участь у синтезі колагену та інших структурних компонентів показклітинного

матриксу та відіграють значну роль у розвитку склеротичних змін легень та порушенні їх функції. Морфологічно окремі фібробласти збільшені в розмірах, з більш вираженою базофілією цитоплазми, що свідчить про активні синтетичні процеси в клітинах. Деякі клітини знаходяться на стадії поділу. В інтерстиції спостерігається інтенсивна дифузна та вогнищева інфільтрація лімфоцитами та еозинофілами. Візуалізуються мастоцити, гістіо-макрофагальні елементи, поодинокі нейтрофіли (рис. 3.3.1).

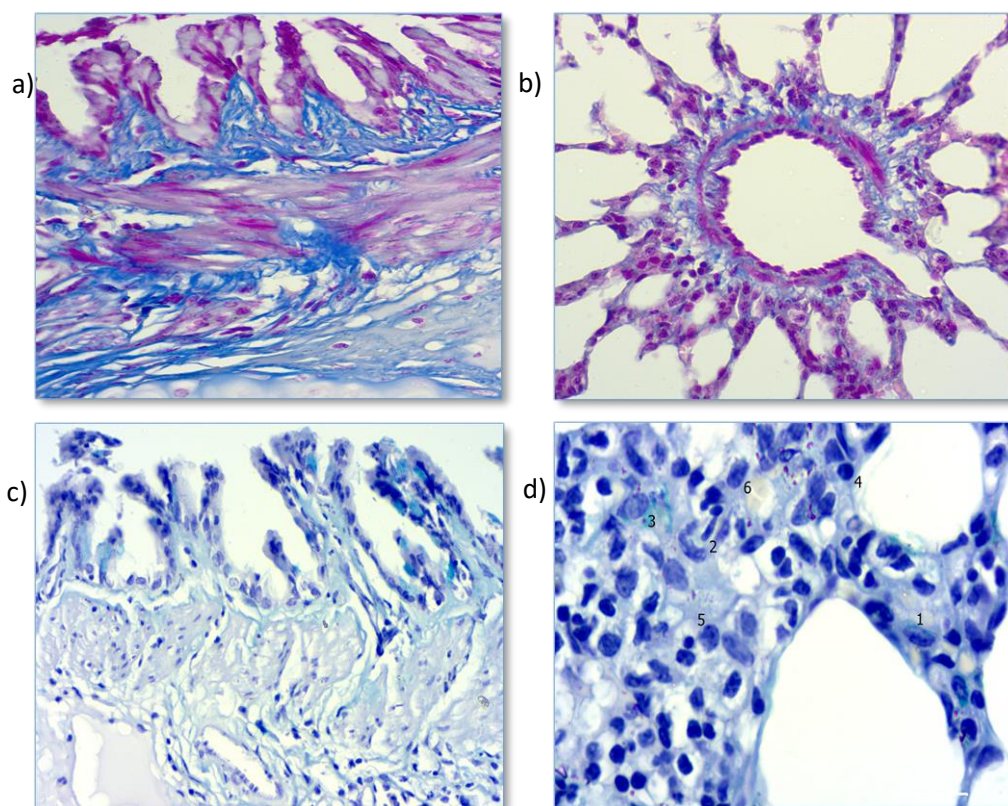


Рисунок 3.3.1 – Мікроскопічні зміни елементів сполучної тканини стінки бронхів та легеневого інтерстицію морської свинки після сенсibiliзації та аероалергізації овальбуміном на 30-ту (3.3.1a, 3.3.1b), 36-ту (3.3.1c), 44-ту (3.3.1d) доби після початку експерименту. 3.3.1a – набряк і дезорганізація колагенових волокон сполучної тканини в стінці бронха середнього калібру; 3.3.1b – нерівномірне потовщення субепітеліальної пластинки в стінці термінальної бронхіоли; 3.3.1c – інтенсивне метахроматичне забарвлення основної речовини

сполучної тканини у стінці бронха; 3.3.1d – клітинний склад сполучної тканини легень: 1 – фібробласт; 2 – фіброцит; 3 – мастоцит; 4 – лімфоцит; 5 – макрофаг.

Забарвлення: 3.3.1a,b – за Масоном; 3.3.1c,d – альціановим синім.

3.3.1a, b, c $\times 400$; 3.3.1d $\times 1000$.

Аналіз кількості сполучнотканинних фіброцитів у легенях морських свинок у ранній період алергічного запалення встановив статистично значиме ($p^{*/**} < 0,05$) збільшення кількості фіброцитів порівняно з контрольною групою на 23-ї добу після експерименту, яке становить $9,5 \pm 0,09$ у полі зору, що в 1,7 раза більше, ніж у контрольній групі (рис.3.3.2).

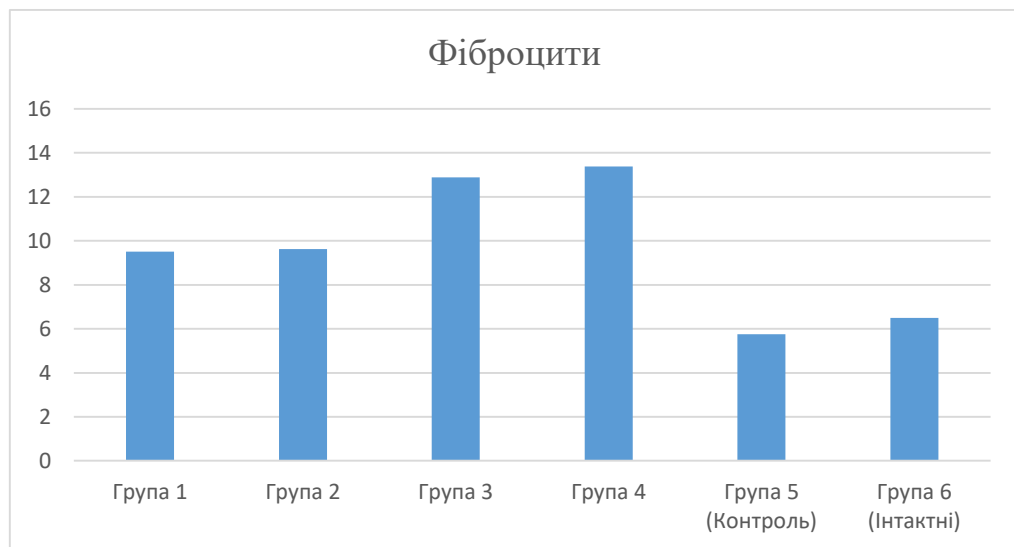


Рис. 3.3.2 Морфометричні зміни кількості фіброцитів дихальних шляхів морської свинки порівняно з контрольною групою ($M \pm m$, $n=8$).

На 30 добу досліду кількість фіброцитів продовжила збільшуватися, та становила в середньому $9,62 \pm 0,16$. У третій контрольній групі морських свинок на 36 добу експерименту кількість фіброцитів в 2,25 рази перевищувала контрольні показники, становивши вже в середньому $12,88 \pm 0,15$ клітин. Також існує істотна різниця між середньою кількістю фіброцитів у тварин 2-ої та 3-ої груп після сенсibiliзації овальбуміном, коефіцієнт приросту за цей період склав 1,34. У 4-й експериментальній групі тварин зберіглась тенденція до збільшення кількості цих

клітин, хоча дія алергену була припинена більше ніж 2 тижні тому. При цьому досягається максимальний коефіцієнт збільшення – в 2,3 рази перевищено значення контрольної групи. Таким чином, констатована статистично достовірна тенденція до збільшення кількості фіброцитів впродовж всього терміну експерименту.

Порівняння дослідних груп тварин під час експерименту проводили з результатами контрольної групи, тому що в ході проведених досліджень не виявлено статистично значущих відмінностей вмісту клітин гістогенного диферону між морськими свинками інтактної та контрольної груп на 23, 30, 36 і 44 добу від початку експерименту. У тварин контрольної групи, яким вводили 0,9% розчин NaCl, та у інтактних тварин кількість фіброцитів легень склала $5,75 \pm 0,17$ та $6,5 \pm 0,24$ відповідно. Цей факт свідчить про відсутність впливу маніпуляцій під час експерименту та стресового фактору на зміни вмісту клітин гістогенного ряду в сполучній тканині легень морських свинок.

Зіставлення результатів експериментальних груп та контрольної у ході спостереження показало статистично достовірне ($p^{*/**} < 0,01$) зростання кількості активних фібробластів у легенях морських свинок у ранній період алергічного запалення, при цьому першій дослідній групі на 23 добу експерименту відбувався максимальний приріст кількості клітин з коефіцієнтом росту 1,8; середня кількість клітин становила $12,75 \pm 0,21$ у полі зору.

На 30 добу досліду у 2-й дослідній групі виявлено достовірне збільшення кількості фібробластів ($p^{*/**} < 0,01$) у порівнянні з контрольною групою, яке склало в середньому $11,75 \pm 0,22$ клітин. Але визначена кількість була меншою ніж у 1-й дослідній групі, коефіцієнт росту 1,65 (рис. 3.3.3).

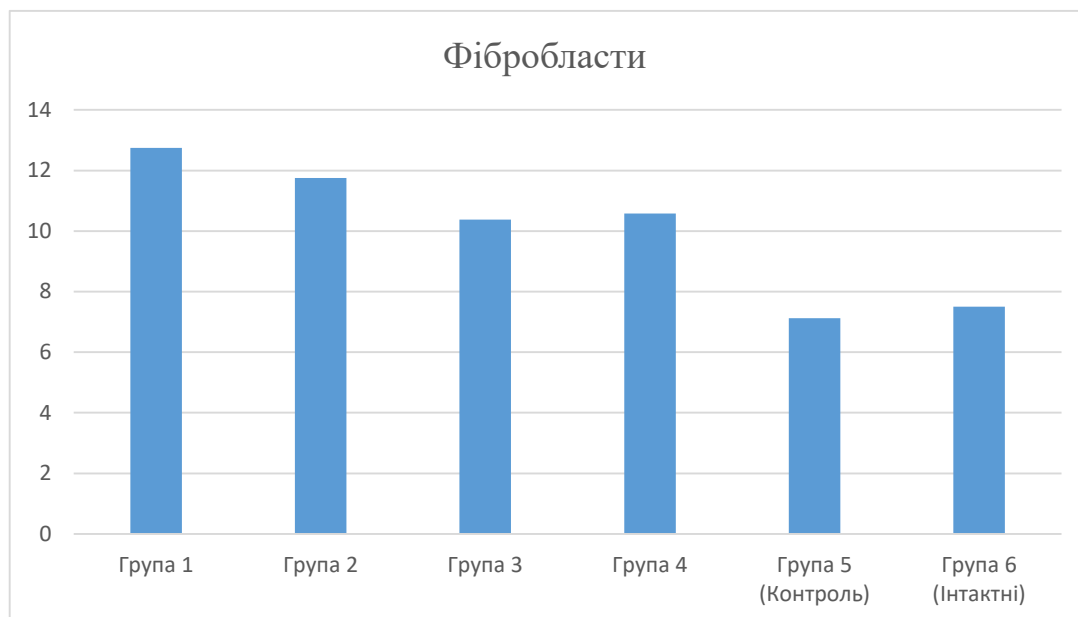


Рис. 3.3.3 Морфометричні зміни кількості фібробластів дихальних шляхів морської свинки порівняно з контрольною групою ($M \pm m$, $n=8$).

У пізньому періоді алергічного ОВА-індукованого запального процесу в легенях відбувалося подальше зниження кількості фібробластів у порівнянні з кількістю цих клітин у 1-й та 2-й експериментальних групах, яке склало $10,38 \pm 0,27$ клітин у полі зору на 36-ту добу від початку досліджу. Коефіцієнт збільшення 1,5. Але у порівнянні з контрольною групою кількість клітин залишається збільшеною, зростання є статистично значимим ($p^{*/**} < 0,05$).

Тобто, морфометричне дослідження цих більш молодих клітин гістогенного ряду, здатних до активного поділу, виявило значне збільшення їх кількості у сполучній тканині легень на ранньому етапі дослідження. Зі збільшенням часу експерименту спостерігалось поступове зменшення кількості фібробластів.

В ході підрахунку співвідношення фібробластів та фіброцитів (фібробластно-фіброцитарний коефіцієнт) для визначення рівню направленості змін кількості клітин гістогенного диферону було виявлено тенденцію до поступового переважання зрілих клітин гістогенного диферону над фібробластами на фоні загального збільшення клітин фібробластичного ряду у сполучній тканині легень морських свинок при ОВА-індукованому алергічному запаленні.

Так у першій групі тварин цей коефіцієнт склав 1,37, у другій 1,29, що дещо менше від аналогічного показника в контрольній групі (1,46) і демонструє перевищення кількості фібробластів. На пізньому етапі дослідження співвідношення істотно змінилось у бік переважання дозрілих фіброцитів, які продовжують виконувати репаративну функцію та виробляти активні речовини, фібробластно-фіброцитарний коефіцієнт склав 0,81 та 0,82 у 3-й та 4-й групах відповідно (рис. 3.3.4).

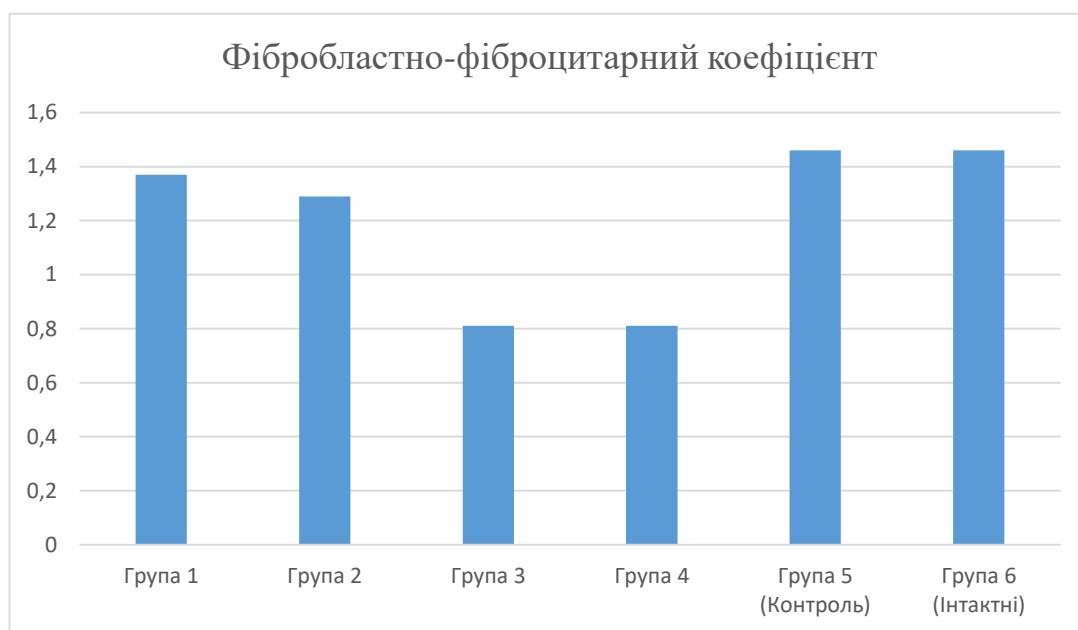


Рис. 3.3.4 Співвідношення кількості фібробластів та фіброцитів дихальних шляхів морської свинки порівняно з контрольною групою ($M \pm m$, $n=8$).

Показана тенденція до поступового значного зменшення кількості фібробластів зі збільшенням часу експерименту. Коефіцієнт фібробласти/фіброцити статистично вірогідно знижується в 1,8 рази в пізньому періоді розвитку алергічного запального процесу в легенях порівняно з аналогічним показником у контрольній групі, що свідчить про поступовий розвиток фіброзу.

Проведене дослідження визначає закономірність динаміки морфологічних змін клітинних елементів сполучної тканини легень. Експериментальна сенсibilізація та інгаляційна алергізація овальбуміном призводить до статистично

значимого збільшення середньої кількості фібробластів та фіброцитів протягом всіх термінів спостереження у всіх експериментальних групах. Максимальна кількість фібробластів має місце протягом раннього періоду розвитку алергічного запалення в легенях на 23-тю добу спостереження, після чого спостерігається тенденція до поступового зменшення їх вмісту до 44-ої доби після початку експерименту. На відміну від динаміки фібробластів, середній вміст фіброцитів поступово збільшується протягом експерименту, з максимальним коефіцієнтом збільшення на 44-ту добу спостереження. Даний різнонаправлений характер динаміки клітин відображають показники фібробласто-фіброцитарного коефіцієнту протягом експерименту, які свідчать про диспропорційність у співвідношенні фібробласти/фіброцити, особливо у пізньому періоді розвитку алергічного запалення в легенях.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

При гістологічному дослідженні легень морських свинок було виявлено ознаки алергічного запалення у результаті сенсibilізації та інгаляції овалбуміном, а як відомо, при БА запальні зміни в слизовій оболонці бронхів носять алергічний характер. Обраний вид тварин став ідеальною моделлю для даного експерименту ще й тому, що в морських свинок, як і в людей, при розвитку анафілактичної реакції гіперчутливості дихальна недостатність настає саме внаслідок спазму бронхіол [19].

Так, основними клітинними елементами при алергічному запаленні є еозинофіли, базофіли, тучні клітини, Т-лімфоцити, макрофаги. Була виявлена дифузна та вогнищева інфільтрація периваскулярних та інтраепітеліальних ділянок легень лімфоцитами, які, вірогідно, і є первинною ланкою в ініціації реакцій за Th2-залежним механізмом імунної відповіді, що супроводжується активацією алергічної реакції у бронхіальній стінці за участі еозинофілів та тканинних базофілів.

Алергічне запалення у сполучній тканині дихальних шляхів пов'язане з посиленою міграцією мастоцитів, а також зі збільшенням тривалості їхнього життя. У досліджених групах це відбивалося у статистично значимому збільшенні загальної кількості мастоцитів, що є спільною рисою для людей і тварин [5, 12]. Проте було виявлено що, на відміну від людини, мастоцитів, пов'язаних зі слизовою оболонкою, зазвичай більше в легенях морської свинки, ніж периваскулярних. Отримані дані виявили найбільшу кількість мастоцитів слизових оболонок на ранньому етапі експерименту з овалергізації морських свинок, що демонструє початковий період розвитку алергічного запалення, коли реакції проходять в слизових оболонках дихальних шляхів як місці первинного поверхневого контакту з алергеном. Так, дегрануляція мастоцитів при контакті з IgE вивільняє в оточуючі тканини активні речовини, що призводить до збільшення проникності капілярів і подальшій міграції активних клітин до місця ушкодження. Подальша участь тканинних базофілів є визначальною для морфологічних та

гістохімічних змін мікроциркуляторного русла, клітин лімфоїдної тканини, сполучної тканини легеневого інтерстицію. У ході експерименту ця концепція підтверджувалася різноспрямованою динамікою різних типів мастоцитів. Дослідження демонструє максимальне збільшення кількості периваскулярних тучних клітин у пізній період розвитку алергічного запального процесу в легенях тварин 4-ї дослідної групи. Вірогідно надалі саме периваскулярні мастоцити сприяють підтримці хронічного алергічного запалення дихальних шляхів. Як відомо, завдяки наявності гепарину, що виділяється цими клітинами в міжклітинну речовину сполучної тканини, підвищується проникність мікросудин; це при алергічному запаленні викликає міграцію лімфоцитів і плазматичних клітин у периваскулярну міжклітинну речовину [24, 29]. Отже, мастоцити мають вирішальне значення для ініціації імунної відповіді на алерген, під час якої вони передають сигнали, що стимулюють синтез IgE плазматичними клітинами та диференціацію Th2-лімфоцитів [25].

При електронно-мікроскопічному дослідженні встановлено, що при ОВА-індукованому алергічному запаленні в легенях експериментальних груп морських свинок серед мастоцитів домінували активні клітинні форми з підвищеною кількістю та ущільненим розташуванням специфічних оптично-щільних гранул. Знижена кількість гранул в окремих виявлених мастоцитах є ознакою дегрануляції та вивільнення активного вмісту гранул в навколишні тканини. Збільшення напівпорожніх клітин може свідчити про важкість перебігу алергічного запалення та підвищений ризик розвитку важких ускладнень. Таке блискавичне вивільнення великої кількості активних речовин, таких як гістамін, серотонін, гепарин, калікреїн, триптази, хілази, лейкотрієни, тромбоцитарноактивуючий фактор, хемотаксичні фактори, гістамінази, катіонні білки, протеази тощо, може спричинити тяжкі наслідки. Подібні висновки присутні і в роботах інших учених [19, 29].

Відомо, що вміст гранул еозинофілів представлено агресивними білками (еозинофільний катіонний білок, головний білок з основними властивостями), які в сукупності з кисневими радикалами мають потужну цитотоксичну активність по

відношенню до бронхіального епітелію [21]. З цим можна пов'язати констатоване збільшення числа мастоцитів, а саме мастоцитів слизових оболонок, виявлення низькогранульованих клітин а також ексфоціацію поверхневого епітеліального пласта. У свою чергу пошкоджений епітелій виробляє велику кількість цитокінів, хемокінів та ростових факторів, які стимулюють функціональну активність запальних клітин та беруть участь у структурній та функціональній перебудові бронхіального дерева. Відповідно до сучасних поглядів, слизова оболонка дихальних шляхів є активним учасником імунологічної відповіді, яка регулює, у тому числі, і її структурні порушення [4, 5].

Робота демонструє наявність суттєвих змін мікроциркуляторного русла, які з'являються вже на ранньому етапі розвитку індукованого алергічного запального процесу і наростають в міру зменшення калібру судин, такі як у підвищення питомого об'єму судин із ультраструктурними ознаками реологічних розладів (стаз, сладж, тромбоз)), що призводять до порушення перфузії через мікросудини, блокаді транскапілярного обміну та дистрофічним змінам ендотеліальних клітин. Це підтверджує той факт, що при хронічній астмі відбуваються якісні та кількісні зміни капілярів, що формують судинний компонент ремоделювання бронхів. Ультраструктурні ознаки ендотеліальної дисфункції призводять до посилення запальних процесів з активацією поза- та внутрішньоклітинного набряку та розвитку неконтрольованої бронхіальної гіперреактивності [25].

Недостатність трофіки капілярів, проявом якої є виявлене зменшення об'ємної щільності МПВ, супроводжується фіброзом власної пластинки слизової оболонки бронхів і, безумовно, посилює гіпоксію. Редукція істинних капілярів та периваскулярний фіброз є доміантними патоморфологічними ознаками та відіграють ключову роль у бронхоконстрикції та бронхіальній гіперреактивності.

В ході експерименту з індукції алергічного запалення була отримана певна динаміка кількості келихоподібних клітин і PAS-позитивних речовин дихальних шляхів і респіраторної частини легень, яка пояснює найбільш виражені прояви неспецифічних механізмів резистентності дихальної системи на ранніх стадіях розвитку алергічного запалення. Збільшення PAS-позитивної речовини

відбувалось нерівномірно, на ранньому етапі виражена позитивна реакція спостерігалась на поверхні слизових оболонок, що свідчить про збільшення продукції легеневого сурфактанта, який є ланкою вродженого імунітету і першим приймає участь у регуляції захисту легень та імунній відповіді [44].

Інтенсивною інфільтрація слизової оболонки ефекторними клітинами при алергічному запалення спричиняє виникнення келихоподібно-клітинної гіперплазії, що стає важливою причиною посиленого слизоутворення з формуванням бронхообструктивного синдрому[43]. Гіперсекреція слизу, обумовлена як збільшенням кількості келихоподібних клітин, так і розширенням кінцевих відділів білково-слизових залоз, призводить до обструкції бронхів, формуючи блокаду дихальної прохідності, що супроводжується розвитком нападів ядухи. Описане в ході дослідження збільшення кількості PAS-позитивних клітин, починаючи з другої групи тварин експерименту та виявлені морфологічні зміни розміру клітин та переповнення їх слизовим секретом підтверджують розвиток келихоподібноклітинної гіпертрофії при алергічному запальному процесі.

У пізньому періоді розвитку експериментального овалбумініндукованого алергічного запалення (36-44-та доби експерименту) переважають прояви специфічної резистентності дихальної системи у вигляді активації локальних ланок клітинного та гуморального адаптивного імунітету. Цей факт підтверджується збільшенням кількості периваскулярних і перибронхіальних лімфоїдних скупчень у легенях морських свинок.

Персистенція алергічного запалення в сполучній тканині легень морських свинок під час проведення ОВА-індукованої алергізації супроводжувалася потовщення слизової оболонки та адвентиційної оболонки бронхів за рахунок збільшення відносного об'єму пухкої сполучної тканини, що є наслідком реакції компонентів сполучної тканини на алергічне запалення. При чому найістотніше збільшення спостерігалось саме у 1-й групі, що демонструє швидке розгортання репаративних процесів у відповідь на дію патогену.

Колагенові волокна є найбільш поширеними елементами міжклітинній речовині легень, що становлять приблизно 70% легеневої тканини, і зміна

структури, кількості або геометрії їх розподілу може викликати зміни у функціонуванні легень. Тому колаген, що виробляється у відповідь на цитокін TGF- β , є потенційним маркером ремоделювання легень.

Виявленні в ході експерименту за допомогою PAS-реакції глікопротеїни та протеоглікани є важливими в процесі ремоделювання і відіграють роль у взаємодії фібрил і фіброгенезі колагену в тканині з іншими компонентами позаклітинного матриксу. І хоча процес ремоделювання потенційно шкідливий для функції легень, вважається, що така відповідь є спробою захиститися від впливу алергічного запалення. Попередні дані показали, що без ремоделювання тканин у пацієнтів з БА можуть спостерігатися погіршення симптомів і швидше зниження функції легень [36].

Внаслідок потовщення базальної мембрани, спричиненого запальним процесом в бронхах, що було виявлено під час експерименту та підтверджується іншими авторами, а також під дією прозапальних інтерлейкінів і біогенноактивних речовин, оскільки поблизу базальної мембрани і в самому епітелії їх з'являється велика кількість, трофіка слизової оболонки сильно порушується. Це перешкоджає дифузії поживного матеріалу з кровоносних судин слизової оболонки у бік епітелію та веде до стоншення функціонуючого шару епітелію з посиленням десквамації., потоншення міжальвеолярних перетинок, розширення просвіту альвеол і руйнування компонентів аерогематичного бар'єру [7, 24, 35].

Поставлений експеримент виявив певну динаміку у змінах кількості клітинних елементів сполучної тканини дихальних шляхів. Так, збільшення клітин гістогенного диферону спостерігалось одразу на ранньому етапі та підтримувалось на високому рівні на пізньому етапі експериментальної сенсibiliзації та алергізації ОВА, не зважаючи на припинення дії алергену, що свідчить про тривалу стимуляцію фіброblastів. Відомо, що еозинофіли відіграють важливу роль у виробленні «фібриногенних» ростових факторів, стимулюючих функціональну активність фіброblastів, які на працьовують колагени I, III, IV і VIII типів. Колагени відкладаються в тому числі на базальній мембрані, викликаючи її потовщення, що

спостерігається в біоптатах слизової оболонки бронхів у пацієнтів з тяжкою формою бронхіальної астми.

Максимальний ріст кількості фібробластів спостерігався на 23-тю добу у першій групі експериментальних тварин, в подальшому кількість фібробластів поступово зменшувалась, але все одно залишалась в 1,5 більшою за контрольні показники у 4-й групі тварин. Поступове стихання може свідчити про дію антагоністичних факторів, що намагаються загальмувати розвиток запальної реакції в сполучній тканині. Динаміка зміни кількості фіброцитів сполучної тканини навпаки досягає максимального результату у 4-тій групі експериментальних тварин на 44-ту добу експерименту. Тобто мають місце різнонаправлені зміни кількості клітин гістогенного диферону, що відображається при визначенні фібробластно/фіброцитарного коефіцієнту в хронобіологічному аспекті.

Попередні дослідження показали, що ремоделювання міжклітинного матриксу легень при астмі визначається швидкістю поточного відкладення та деградації білків, включаючи колагени I, III та V, фібронектин, тенасцин, тощо. Ці компоненти, ймовірно, секретуються через активацію фібробластів і міофібробластів [36]. При цьому аналіз зразків бронхіальної біопсії здорових людей продемонстрував, що в слизовій оболонці бронхів у цих суб'єктів є лише невелика кількість фіброцитів або їх зовсім немає.

Отже, зміни, які відбуваються в дихальних шляхах під час ремоделювання, складаються з потовщення базальної мембрани, ангіогенезу та келихоподібної гіперплазії, і пов'язані з необоротною втратою функції легень [35, 36].

Під час експерименту з проведення сенсibiliзації та стимуляції овальбуміном дослідних тварин були виявлені виражені інфільтрація еозинофілами та тканинними базофілами власної пластинки слизової оболонки периваскулярних та інтерстиціальних ділянок дихальних шляхів, келихоподібно-клітинна гіперплазія епітелію, стоншення та атрофія епітеліального пласта, потовщення оболонок бронхів та базальної мембрани.

ВИСНОВКИ

1. У нормі мастоцити слизових оболонок є переважним типом мастоцитів у легенях морських свинок. Сенсibiliзація та інгаляція овальбуміном призводять до статистично значимого збільшення кількості обох фенотипів клітин – мастоцитів слизових оболонок і периваскулярних мастоцитів. Найбільш значущим є збільшення кількості навколосудинних мастоцитів протягом пізнього періоду розвитку алергічного запалення в 4-ій експериментальній групі (в 5 разів порівняно з контролем, $p^{***} < 0,05$). В той час як максимальне збільшення кількості мастоцитів слизових оболонок продемонстровано в 1-ій експериментальній групі (в 1,5 рази порівняно з контролем, $p^{***} < 0,01$).

2. Отримана динаміка розподілу та кількості PAS позитивних клітин, ультрамікроскопічне дослідження дихальних шляхів та респіраторного відділа легень пояснює найбільш виражені прояви неспецифічних механізмів резистентності дихальної системи на ранніх стадіях розвитку алергічного запалення, що полягають в гіпертрофії та збільшенні кількості келихоподібних клітин (в 2,5 рази порівняно з контролем, $p^{***} < 0,05$), підвищенні функціональної активності пневмоцитів II типу, збільшення кількості сурфактанту.

3. Встановлено, що з 23-ої по 44-ту добу після початку експериментальної сенсibiliзації овальбуміном в легенях морських свинок, порівняно з контролем спостерігається поступове збільшення середньої кількості фіброцитів (відповідно 9.5 ± 0.09 у 1-ій експериментальній групі до 13.38 ± 0.14 в 4-ій експериментальній групі, $p^{***} < 0,05$) та зменшення середньої кількості фібробластів (12.75 ± 0.21 у 1-ій експериментальній групі до 10.37 ± 0.27 в 4-ій експериментальній групі, $p^{***} < 0,05$). Різноюнаправлений характер у динаміці кількості клітин сполучної тканини відображає зменшення показника фібробласто-фіброцитарного коефіцієнту від 1.37 ± 0.03 в ранньому періоді до 0.82 ± 0.03 в пізньому періоді розвитку алергічного запалення ($p^{***} < 0,05$), що свідчить про тенденцію до розвитку фіброзу у сполучній тканині легень морських свинок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Передерій В. Г. Основи внутрішньої медицини: в 3 т. Т. 1 / В. Г. Передерій, С. М. Ткач. – Вінниця: Нова Книга, 2018. – 640 с.
2. Чоп'як В.В. Клінічна імунологія та алергологія / В. В. Чоп'як, І О. Потьомкіна, А.М. Гаврилюк та ін. – К.: ВСВ «Медицина», 2017. – 224 с.
3. Нарбутова Т. Є., Лекан Р. Й., Бузовський В. П. Морфологічна характеристика структурних компонентів аорти у дітей з критичною коарктацією аорти / Т. Є. Нарбутова, Р. Й. Лекан, В. П. Бузовський // Досягнення біології та медицини. – 2016. – № 1 (27). – С. 48-52.
4. Ahmed M. Effect Of Melatonin In A Rat Model Of Allergic Lung Inflammation / M. Ahmed, K. Hassanein // Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences. – 2014. – Vol. 34 (2), P. 237-248.
5. Sibilano R. Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways / R. Sibilano, B. Frossi, C. E. Pucillo // European Journal of Immunology. – 2014. – Vol. 44 (9) – 2558-2566.
6. Akdis C. A. Type 2 immunity in the skin and lungs / C. A. Akdis, P. D. Arkwright, M.-C. Brüggemann, W. Busse, M. Gadina, E. Guttman-Yassky, K. Kabashima, Y. Mitamura, L. Wu, J. Vian, O. Palomares // Allergy. – 2020. – Vol. 75(7) – P. 1582-1605.
7. Cai Z. Albiflorin alleviates ovalbumin (OVA)-induced pulmonary inflammation in asthmatic mice / Z. Cai, J. Liu, H. Bian, J. Cai // American Journal of Translational Research. – 2019. – Vol. 11 (12). – P. 7300-7309.
8. Halim T. Y. F. Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical for the Initiation of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation / T. Y. F. Halim, C. A. Steer, L. Mathä, M. J. Gold, I. Martinez-Gonzalez, K. M. McNagny, A. N. J. McKenzie, F. Takei // Immunity. – 2014. – Vol. 40 (3). P. 425-435.
9. Беспалова О. Я. Імунологія та алергологія / О. Я. Беспалова. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. – 51 с.
10. Aksamytieva M.V. Morphological changes in the membranes of the trachea of guinea pigs in experimental ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways /

M.V. Aksamytieva, S.S. Popko, V.M. Evtushenko // *Morphologia*. – 2021. – № 1 (15). – P. 22-27.

11. Самборська І. А. Порівняльна характеристика гістологічних змін тканини легень у щурів різного віку за умов гіпергомоцистеїнемії / І. А. Самборська // *Вісник Вінницького національного медичного університету*. – 2021 – №2 (25) – С. 196-200.

12. Méndez-Enríquez E. Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma / E. Méndez-Enríquez, J Hallgren // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P.1-10.

13. Марковський В. Д. Патоморфологія / В. Д. Марковський, В. О. Туманський та ін. – К.: ВСВ «Медицина», 2015. – 936 с.

14. Сабадишин Р. О. Внутрішня медицина / Р. О. Сабадишин, В.Р. Смоляк, О.С. Гашинська. – Вінниця: Нова Книга, 2019. – 552 с.

15. Bellini A. Interactions between the Bronchial Epithelium and Fibrocytes in the Pathogenesis of Airway Remodeling in Asthma / A. Bellini // *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*. – 2013. – Vol. 6 (1). – P. 1-10.

16. Атаман О. В. Патофізіологія: в 2 т. Т 2. Патофізіологія органів і систем / О. В. Атаман. – Вінниця: Нова Книга, 2016. – 448 с.

17. Бабінець Л.С. Захворювання органів дихання в сімейній медицині / Л.С. Бабінець, І.О. Боровик, Л.Н. Андріюк. – К.: ВСВ «Медицина», 2019. – 312 с.

18. Кумар В. Основи патології за Роббінсом. Т 2 / В. Кумар, А. К. Аббас, Д. К. Астер. – К.: ВСВ «Медицина», 2020. – 532 с.

19. Атаман О. В. Патофізіологія: в 2 т. Т 1. Загальна патологія / О. В. Атаман. – Вінниця: Нова Книга, 2018. – 584 с.

20. Antwi A.O. Stigmasterol modulates allergic airway inflammation in guinea pig model of ovalbumin-induced asthma / A.O. Antwi, D.D. Obiri, N. Osafo // *Mediators Inflamm*. – 2017. – Vol. 2953930.

21. Попко С. С. Реакція еозинофільних гранулоцитів дихальних шляхів морської свинки на експериментальне алергічне запалення за даними морфометричного дослідження / С. С. Попко // *Morphologia*. – 2020. – № 4 (14) – С. 58-63.

22. Lambrecht B. N. The immunology of asthma / B. N. Lambrecht, H. Hammad // *Nature Immunology*. – 2014. – Vol. 1 (16). – P. 45–56.
23. Волковой В. А. Патологічна анатомія / В. А. Волковой, Н.М. Кононенко, В.В. Гнатюк та ін. – Х.: НФаУ: Золоті сторінки, 2013. – 392 с.
24. Кумар В. Основи патології за Роббінсом. Т 1 / В. Кумар, А. К. Аббас, Д. К. Астер. – К.: ВСВ «Медицина», 2019. – 420 с.
25. Popko S. S. Microscopic, submicroscopic characterization of pro- and anti-inflammatory cell phenotypes of the lungs in conditions of experimental allergic inflammation / S. S. Popko // *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. – 2022. – Vol. 15 (3). – P. 288-294.
26. Луцик О. Д. Гістологія. Цитологія. Ембріологія / О. Д. Луцик, Ю. Б. Чайковський, Р. О. Білий. – Вінниця: Нова Книга, 2020. – 496 с.
27. Bulfone-Paus S. Mast Cells as Regulators of T Cell Responses / S. Bulfone-Paus, R. Bahri // *Frontiers in Immunology* – 2015. – Vol. 6.
28. Доценко С. Я. Клінічна імунологія / С. Я. Доценко, І. І. Токаренко та ін. – Запоріжжя: ЗДМУ, 2016. – 256 с.
29. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation / K. Amin // *Respiratory Medicine*. – 2012. – Vol.106 (1) – P. 9-14.
30. Bankova L. G. Maturation of mast cell progenitors to mucosal mast cells during allergic pulmonary inflammation in mice / L. G. Bankova, D. F. Dwyer, A. Y. Liu, K. F. Austen, M. F. Gurish // *Mucosal Immunology* – 2014. – Vol. 8 (3). – P. 596-606.
31. da Silva E. Z. M. Mast Cell Function / E. Z. M. da Silva, M. C. Jamur, C. Oliver // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2014. – Vol. 62 (10). – 698-738.
32. Popko S.S. Distribution and quantitative changes of mast cells in guinea pigs lung in ovalbumin-induced allergic inflammation / S.S. Popko, V.M. Yevtushenko // *International Journal of Medicine and Medical Research*. – 2021. – Vol. 7 (1) – P. 87-92.
33. Krystel-Whittemore M. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell / M. Krystel-Whittemore, K. N. Dileepan, J. G. Wood // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 6.

34. Angeli P. Effects of chronic l-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation / P. Angeli, C. M. Prado, D. G. Xisto, P. L. Silva, C. P. Pássaro, H. D. Nakazato, E. A. Leick-Maldonado, M. A. Martins, P. R. M. Rocco, I. F. L. C. Tibério // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2008. – Vol. 29(6). – P. L1197-L1205.

35. Liu L. Role of Collagen in Airway Mechanics / L. Liu, B. Stephens, M. Bergman, A. May, T. Chiang // *Bioengineering*. – 2021. – Vol. 8 (1) – P. 13.

36. Ito J. T. Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies? / J. T. Ito. J. D. Lourenço, R. F. Righetti, I. F. L. C. Tibério, C. M. Prado, F. D. T. Q. S. Lopes // *Cells*. – 2019. – Vol. 8 (4). – P. 342.

37. Barrios J. Pulmonary Neuroendocrine Cells Secrete γ -Aminobutyric Acid to Induce Goblet Cell Hyperplasia in Primate Models / J. Barrios, A. T. Kho, L. Aven, J. A. Mitchel, J.-A. Park, S. H. Randell, L. A. Miller, K. G. Tantisira. X. Ai // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 60 (6). – P. 687-694.

38. Michalik M. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma / M. Michalik, K. Wójcik-Pszczola, M. Paw. D. Wnuk, P. Koczurkiewicz, M. Sanak, E. Pękala, Z. Madeja // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2018. – Vol. 75 (21). – P. 3943-3961.

39. Mattoli S. Involvement of fibrocytes in asthma and clinical implications / S. Mattoli // *Clinical & Experimental Allergy* – 2015. – Vol. 45 (10). – P. 1497-1509.

40. Твердохліб І. В. Фібробласти шкіри: термінологія, гетерогенітет субпопуляцій і загальні властивості / І. В. Твердохліб, Ю. В. Сілка / *Morphologia*. – 2020. – № 4 (14). – С. 108-114.

41. Мазур О.Ю. Патоморфологічні зміни легень у померлих з ожирінням: огляд літератури та аналіз власних спостережень / О. Ю. Мазур, Ю. І. Кузик // *Morphologia*. – 2018. – № 3 (12). – С. 90-98.

42. Adner M. Back to the future: re-establishing guinea pig in vivo asthma models / M. Adner, B. J. Canning, H. Meurs, W. Ford, P. Ramos Ramírez, van den Berg,

P. M. Mariska, M. A. Birrell, E. Stoffels, K. Lundblad, A. Lennart, P. Nilsson, G. K. Olsson, M. Henric, G. Belvisi, S.-E. Dahlén // *Clinical Science*. – 2020. – Vol. 134 (11). – P. 1219-1242.

43. Meyerholz D. K. Glycogen depletion can increase the specificity of mucin detection in airway tissues / D. K. Meyerholz, A. P. Beck, J. A. Goeken, M. R. Leidinger, G. K. Ofori-Amanfo, H. C. Brown, et al. // *BMC Research Notes*. – 2018. – Vol. 11 (1). – P. 763.

44. Winkler C. Surfactant and allergic airway inflammation / C. Winkler, J. M. Hohlfeld // *Swiss Medical Weekly*. – 2013. – Vol. 143 (w13818). – P. 1-10.

45. Dey P. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. – Singapore: Springer Singapore, 2018. – 275 p.